

UNIVERSITE DU QUEBEC

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE ES SCIENCES (SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT)

PAR

GAETAN MUNGER

B. Sp. SCIENCES (BIOCHIMIE)

DÉTERMINATION DU POIDS MOLÉCULAIRE DE PROTÉINE
À L'INTERFACE AIR/EAU PAR UN NOUVEAU SYSTÈME À
FAIBLE PRESSION DE SURFACE

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

RESUME

La détermination du poids moléculaire demande une accessibilité aux très faibles pressions de surface ($< 0.100 \times 10^{-5}$ newton/cm) et un comportement "idéal" de la monocouche. L'appareillage actuel déterminant les courbes de pression de surface présente une sensibilité de l'ordre de 0.1×10^{-5} newton/cm. Cette précision est utile dans la mesure de propriétés de surface de phospholipides, de lipides, d'alcools à longue chaîne saturée et insaturée. Dans le cas de protéines, nous devons examiner ces propriétés à faible pression de surface c'est pourquoi nous avons construit un type spécial de bain de Langmuir dont la sensibilité est grandement améliorée, soit 0.0005×10^{-5} newton/cm. Le principe est basé sur une méthode de détection utilisant des phototransistors et des fibres optiques.

A la suite d'un travail élaboré sur les courbes de pression de surface des protéines qui permet de connaître leur comportement à l'interface air/eau, nous avons déterminé leur poids moléculaire. A cette fin, nous utilisons les caractéristiques d'un film gazeux en deux dimensions que l'on exprime sous la forme suivante:

$$(1) \quad FA = nRT + nSF$$

F: pression de surface
A: surface occupée par les molécules
S: surface occupée par une mole de protéine en monocouche
n: nombre de mole de protéine

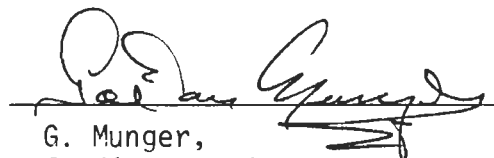
$$(2) \quad FA = \frac{P}{M} \times RT \quad F \rightarrow 0$$

R: constante des gaz
T: température absolue
M: poids moléculaire
P: poids de protéine déposée à la surface

En utilisant l'équation (2), nous avons déterminé le poids moléculaire des protéines avec une précision supérieure à plusieurs méthodes expérimentales.



R.M. Leblanc,
Directeur de recherche



G. Munger,
Etudiant gradué

REMERCIEMENTS

La recherche fondamentale soulève toujours une foule de questions. Le côté fascinant de ces interrogations c'est qu'il y a toujours une solution possible..

Un de ceux qui ne s'effraient pas de ce genre de difficulté, qui fut un soutien constant et en qui ma confiance est entière, mon directeur de thèse le Docteur Roger M. Leblanc. A lui je rends un hommage particulier et lui dit merci.

Je remercie également le Docteur Julian Gruda pour ses judicieux conseils et son équipe de recherche qui nous a fourni si aimablement quelques protéines.

Un merci spécial à Christophe Kossi pour la rhodopsine dont je me suis servi, aux techniciens du Département de chimie-biologie, des ateliers d'électronique et de mécanique pour leurs conseils efficaces et leur grande patience. Merci également aux gens des pâtes et papier qui m'ont si gentiment prêté une des colonnes à distillation.

Enfin, un profond remerciement à Suzel, mon épouse, pour sa patience, sa coopération durant la préparation de ce travail et au temps précieux qu'elle a mis à la transcription de ce manuscrit.

A elle, cette thèse est affectueusement dédiée.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	i
TABLE DES MATIERES	ii
GRAPHIQUES	vi
SCHEMAS	viii
TABLEAUX	ix
INTRODUCTION	1
Généralités	2
Théorie sur le piège d'énergie	3
Théorie sur l'état des protéines à l'interface air/eau	4
But de la thèse	16
MATERIEL	18
Préparation des protéines	19
Albumine de bovin	21
<u>G</u> actine (muscle de lapin)	23
Cytochrome <u>c</u> (coeur de cheval)	24
Ovalbumine	26
Rhodopsine de bovin	26
Résumé	27
Produits utilisés	28
Purification de l'eau	36
Description des systèmes employés pour la purification de l'eau	40
Système Barnstead	40
Système "Corning pyrex ^R brand glass and Teflon ^R (Mega- Pure TM)"	40
Système à triple distillations	41
Système de Pegasus: colonne à plateaux	42

Système millipore type Super Q (SQ)	42
Premier élément	43
Deuxième élément	43
Troisième élément	44
Quatrième élément	44
Système en quartz Bi-18	45
Nettoyage des lamelles de verre et de quartz pour dépositions .	47
Traitements préliminaires	49
Sulfo-chromique chaud ou froid	49
HCl dilué - HNO ₃ dilué	49
H ₂ O ₂ - H ₂ SO ₄	50
HF - H ₃ PO ₄	51
Acide non-chromique	51
Produit alcalin	51
"Plasma cleaner" - Ultrasons	52
Séchage	54
Traitements des lamelles après le nettoyage et le séchage . .	55
MONTAGE DE SYSTEMES BASES SUR LE PRINCIPE DE LANGMUIR	57
Système à forte pression de surface	59
Méthode du cadran gradué en degrés	59
Principes de la technique des monocouches	64
Etalonnage	70
Standardisation du bain	72
Courbes de pression de surface	72
Méthode du transducteur magnétique linéaire	73

Système à faible pression de surface	79
Utilisation de fibres optiques	82
Principe de fonctionnement	82
Etalonnage	84
Standardisation	87
RESULTATS	90
Préparation des protéines	91
Albumine de bovin	91
<u>G</u> actine (muscle de lapin)	96
Cytochrome <u>c</u> (coeur de cheval)	100
Ovalbumine	102
Rhodopsine de bovin	102
Système à forte pression de surface	106
Méthode des degrés	106
Etalonnage	106
Standardisation	109
Courbe de pression de surface des protéines	115
Albumine de bovin	116
<u>G</u> actine (muscle de lapin)	118
Cytochrome <u>c</u> (coeur de cheval)	120
Ovalbumine	122
Rhodopsine de bovin	124
Avec le transducteur magnétique linéaire	131
Etalonnage	131
Standardisation	131

Système à faible pression de surface	135
Etalonnage	136
Standardisation	139
Détermination du poids moléculaire des protéines	140
Poids moléculaire de l'albumine de bovin	140
Poids moléculaire de la <u>G</u> actine (muscle de lapin)	142
Poids moléculaire du Cytochrome <u>c</u> (coeur de cheval).	144
Poids moléculaire de l'Ovalbumine	146
Poids moléculaire de la Rhodopsine de bovin	146
DISCUSSION SUR LA DETERMINATION DU POIDS MOLECULAIRE DES	
PROTEINES A L'INTERFACE AIR/EAU	151
CONCLUSION	167
BIBLIOGRAPHIE	169
ANNEXE	182

GRAPHIQUES

1. Dispersion optique rotatoire de l'albumine de bovin avec et sans urée pour la détermination du pourcentage d'alpha-hélicité	94
2. Concentration de la <u>G</u> actine suite à sa purification sur une colonne de Séphadex G-200	98
3. Spectre uv-visible du cytochrome <u>c</u>	101
4. Spectre d'absorption de la rhodopsine de bovin en solution dans de l'Ammonyx LO	105
5. Calibration avec un fil de torsion de 0.023 cm de diamètre: système à forte pression de surface	107
6. Courbes de pression de surface du cholestérol	110
7. Courbes de pression de surface de l'acide stéarique	112
8. Courbes de pression de surface de l'acide arachidique sur une sous-phase de chlorure de cadmium ($10^{-4}M$)	113
9. Courbes de pression de surface de l'acide stéarique selon différents auteurs et comparaison avec notre courbe moyenne	114
10. Courbes de pression de surface de l'albumine de bovin	117
11. Courbes de pression de surface de la <u>G</u> actine	119
12. Courbes de pression de surface du cytochrome <u>c</u>	121
13. Courbe de pression de surface de l'ovalbumine	123
14. Courbes de pression de surface de la rhodopsine de bovin	125
15. Calibration avec un fil de torsion de 0.038 cm de diamètre: système utilisant un transducteur magnétique linéaire	132
16. Courbes de pression de surface du cholestérol et de l'acide arachidique avec le transducteur. Fil de torsion de 0.038 cm de diamètre	134
17. Calibration avec un fil de torsion de 0.033 cm de diamètre: système à faible pression de surface	137

18.	Calibration avec un fil de torsion de 0.038 cm de diamètre: système à faible pression de surface	138
19.	Détermination du poids moléculaire de l'albumine de bovin: système à faible pression de surface	141
20.	Détermination du poids moléculaire de l'albumine de bovin: système à faible pression de surface. Effet de la concentration	143
21.	Détermination du poids moléculaire de la <u>G</u> actine: système à faible pression de surface	145
22.	Détermination du poids moléculaire du cytochrome <u>c</u> : système à faible pression de surface	147
23.	Détermination du poids moléculaire de l'ovalbumine: système à faible pression de surface	148
24.	Détermination du poids moléculaire de la rhodopsine de bovin: système à faible pression de surface	150
25.	Détermination du poids moléculaire de l'albumine de bovin: système à forte pression de surface	153
26.	Courbe de FA en fonction de F pour l'ovalbumine à l'interface air/eau selon Guastalla, J. (1943) et Munger, G. (présent travail)	164
27.	Courbe de FA en fonction de F pour l'ovalbumine à l'interface air/eau selon Bull, H.B. (1945a) et l'équation de Singer, J.J. (1948)	165

SCHEMAS

1.	Représentation de la protéine native et à l'interface air/eau selon ses groupements polaires et apolaires	4
2.	Représentation de l'orientation de résidus d'une chaîne polypeptidique à l'interface air/eau	8
3.	Représentation schématique d'une molécule de protéine à l'interface air/eau a) complètement étendue b) partiellement orientée	9
4.	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS pour vérification de la pureté des protéines	22
5.	Ressemblance structurale entre le hème du cytochrome <u>c</u> et la chlorophylle <u>a</u>	25
6.	Bain servant à l'étude des isothermes	60
7.	Représentation de la méthode de Trurnit pour l'étalement des protéines	69
8.	Utilisation du transducteur magnétique linéaire afin de déterminer la force appliquée sur le flotteur par la monocouche	75
9.	Transducteur magnétique linéaire	77
10.	Plan du montage mécanique du système à faible pression de surface	81
11.	Plan du système électronique du montage à faible pression de surface	83
12.	Filtre passe-bas	85
13.	Représentation du signal	86

TABLEAUX

1. Caractéristiques des produits chimiques	30
2. Caractéristiques des appareils et matériels	33
3. Récapitulation des résultats obtenus des différents systèmes pour la purification de l'eau	46
4. Purification de la rhodopsine avec le Triton X-100	103
5. Sensibilités obtenues par le système des degrés selon différentes caractéristiques du fil de torsion	108
6. Comparaison des aires moléculaires expérimentales obtenues pour le cholestérol, l'acide arachidique et l'acide stéarique en fonction des valeurs de références	115
7. Différentes sous-phases utilisées pour les protéines, le pH, la température, la surface occupée en m^2/mg à 5×10^{-5} newton/cm (dyne/cm) ainsi que l'endroit approximatif où se situe le collapse	127
8. Sensibilité du système avec un transducteur magnétique linéaire suivant le diamètre du fil de torsion	133
9. Détermination du poids moléculaire à faible pression de surface selon différents auteurs	155
10. Poids moléculaires des protéines selon différentes techniques	159
11. Détermination du poids moléculaire de l'ovalbumine à l'interface air/eau expérimentalement et théoriquement . . .	163
12. Composition en g/100g en acide aminé pour les protéines étudiées	184
13. Caractéristiques principales des protéines étudiées	185

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Généralités

Depuis plusieurs années, un nombre grandissant de chercheurs s'intéressent à l'aspect monomoléculaire des films à l'état solide, à l'état liquide ou à l'état gazeux. Rappelons que c'est surtout avant la seconde guerre mondiale que les théories fondamentales ont été formulées. Après les années cinquante, la recherche a pris beaucoup de temps à redémarrer du côté monocouche. Aujourd'hui, le nombre d'applications grandissantes de l'état monomoléculaire en fait un outil de plus en plus attrayant.

En pratique, le dipôle formé à l'interface air/eau est l'aspect primordial. Plusieurs projets de recherche peuvent en être tirés en faisant réagir le film avec une substance en solution ou en le déposant sur différents types de lamelles. On peut également utiliser des techniques basées sur des propriétés physico-chimiques du film.

Théorie sur le piège d'énergie

Les processus primaires de la phase lumineuse de la photosynthèse se divisent en quatre parties, soit (a) l'absorption de la lumière et la formation d'états électroniques excités, (b) le transfert de l'excitation électronique entre un pigment accessoire et la chlorophylle a ainsi que le transfert d'énergie entre les molécules de chlorophylle (b — a, a — a), (c) le piège de l'excitation à un endroit particulier connu comme étant le piège d'énergie ou le centre réactionnel, finalement (d) l'initiation de l'étape chimique via le transfert d'électron d'un donneur à un accepteur. Parmi ces étapes, celle du piège d'énergie semble de première importance car c'est à ce stade que la transformation de l'énergie solaire en énergie chimique a lieu. Récemment, des mesures concernant l'orientation des pigments photosynthétiques ont montré un fort degré d'orientation des composants du centre réactionnel comparé à ceux de la membrane (Vermeglio, A. et Clayton, R.K. (1976)). Nous savons que l'acte photochimique se présente aux sites situés dans les membranes lipoprotéiques, par conséquent l'examen de l'interaction chlorophylle/protéine est important pour connaître la nature de la transformation énergétique (Sauer, K. (1975)). Nous croyons qu'il serait opportun d'obtenir un système de mesure permettant à la fois d'orienter les pigments photosynthétiques et de déterminer l'interaction entre les pigments situés dans une couche protéique. Dans le présent travail, nous avons tenu compte, tout au cours de l'étude, de ces deux possibilités dans la conception et la réalisation d'un système à faible pression de surface.

Théorie sur l'état des protéines à l'interface air/eau

Dans le cas des protéines et des polypeptides, plusieurs théories sont encore à l'étude. De façon générale, on doit prendre en considération certaines caractéristiques principales telles que la solubilité, le nombre de résidus d'acides aminés, le nombre de groupements SH, le pourcentage de flexibilité en fonction du solvant, le point isoélectrique et surtout les groupements polaire et non polaire de chacun des acides aminés formant la protéine. En fait, la structure tertiaire des protéines est due justement à ces propriétés des chaînes latérales. Les protéines contiennent beaucoup de groupements hydrophobes et ces derniers ont tendance à se regrouper à l'intérieur de la protéine native. Lorsqu'elle est déposée à la surface de l'eau les groupements hydrophobes se retrouvent alors à l'extérieur de l'eau, et les groupements hydrophiles à l'intérieur de l'eau, comme nous le représente le schéma suivant:

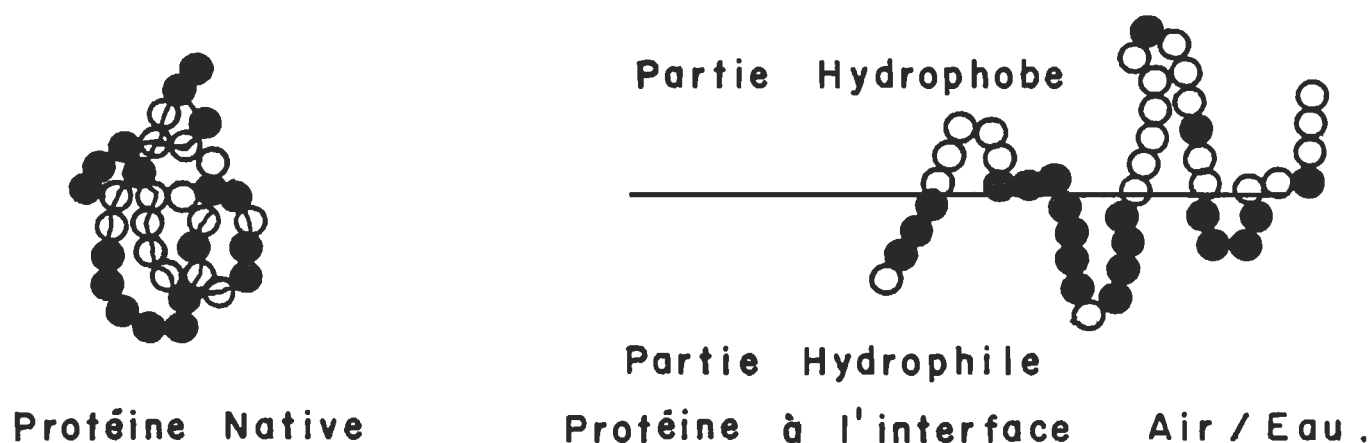


Schéma 1. Représentation de la protéine native et à l'interface air/eau selon ses groupements polaires et apolaires.

Ce que l'on sait depuis longtemps suite aux principaux travaux de Mitchell, J.S. (1937), Langmuir, I. (1939), Bull, H.B. (1947), Cheesman, D.F. et Davies, J.T. (1954), et plus récemment par Davies, J.T. et Rideal, E.K. (1963), Adamson, A.W. (1967), Blank, M. (1969), Evans, M.T.A., Mitchell, J., Mussellwhite, P.R. et Irons, L. (1970), Birdi, K.S. (1972), Malcolm, B.R. (1973-1975) et finalement le travail de Phillips, M.C. (1977) viennent confirmer que la protéine subit un réarrangement qui selon toutes considérations convient d'être appelé un état natif de la protéine.

Lorsque des molécules de protéine native, hautement organisées, sont placées sur une surface aqueuse elles sont promptement étendues sur la surface et forment un film dont l'épaisseur correspond à une chaîne de peptide sans égard aux dimensions originales de la protéine selon la théorie de Bull, H.B. (1947). Il a été suggéré que les protéines à la surface se retrouvent sous la forme de chaînes de β -kératine, à faible pression, et que les chaînes latérales des acides aminés reposent à plat sur la surface. Si l'on augmente la pression sur le film, les chaînes latérales s'orientent alors verticalement à la surface de l'eau. Un simple calcul de l'espace que devrait occuper une chaîne peptidique à faible pression démontre que nous devrions obtenir une aire d'environ $1.8 \text{ m}^2/\text{mg}$ de protéine. Cette valeur est obtenue en se basant sur la distance moyenne entre les chaînes latérales du polypeptide qui est d'environ 3.3 \AA et la distance qu'il devrait y avoir entre chacun des polypeptides soit 10.4 \AA . Nous avons alors comme surface moyenne par résidu $3.3 \times 10.4 = 34.3 \text{ \AA}^2$. Le poids moyen d'un résidu d'acide aminé étant de 115, on peut déduire que la surface occupée serait de $1.8 \text{ m}^2/\text{mg}$ de protéine. A la suite des différents

travaux des auteurs cités plus haut, nous savons que pour les protéines natives, la surface occupée à faible pression est inférieure à $1.8 \text{ m}^2/\text{mg}$. Donc, les chaînes latérales des acides aminés ne reposent pas à plat sur la sous-phase mais sont orientées considérablement. La surface occupée par un résidu avec ses chaînes latérales orientées verticalement est obtenue en calculant, par des mesures aux rayons-X, l'espace entre les chaînes principales. Cette surface est de $4.65 \text{ \AA} \times 3.3 \text{ \AA}$, distance moyenne entre les chaînes latérales, ce qui nous donne 15.3 \AA^2 . Transformé en m^2/mg ceci correspond à $0.80 \text{ m}^2/\text{mg}$ de protéine pour la surface occupée à compressibilité maximum, ce qui est en accord avec les données expérimentales.

Lorsque la protéine est adsorbée à l'interface air/eau, ses chaînes hydrocarbonées s'échappent de la surface de l'eau. Ses chaînes s'organisent les unes avec les autres pour former un film stable. Il est important de noter que cette réorganisation peut être très longue pour certaines protéines comme par exemple le lysozyme. Cette réorganisation dépend du rapport entre les chaînes latérales hydrophiles et celles hydrophobes. Si ces dernières sont plus nombreuses, on aura alors un film stable.

Comme nous l'avons déjà mentionné, toutes les caractéristiques se rapportant à la protéine peuvent influencer son état à l'interface air/eau. En fait quelques règles principales ont été déterminées par Evans, M.T.A. et coll. (1970) sur les protéines à l'interface air/eau.

Premièrement les protéines peuvent former deux types de films à l'interface air/eau et probablement à l'interface huile/eau:

1. Un film dilué, dans lequel toutes les molécules sont dans le même état d'extension (dépliées).

2. Un film concentré, lequel peut contenir seulement des molécules natives et dépliées ou des molécules dans différents degrés d'étalement.

Deuxièmement, trois facteurs principaux peuvent être considérés pour que les protéines forment un film dilué ou concentré à l'interface:

1. L'abaissement dans l'énergie libre de surface produite si la protéine se déplie.
2. Les forces agissant sur la protéine pour la maintenir dans sa configuration native à l'interface air/eau.
3. La pression de surface contre laquelle la molécule doit pousser pour se déplier.

Ces différents énoncés font suite à des travaux préliminaires entre autres celui de Cheesman, D.F. et coll. (1954) qui donne trois règles générales résumant les connaissances que nous avons sur les polypeptides:

1. Dues à des considérations sur l'empaquetage, d'interaction et de lien hydrogène, à l'exception sur une sous-phase acide, les polymères ayant seulement des résidus non polaires sont pliés à l'interface air/eau avec leurs chaînes latérales d'acides aminés qui sont alternativement dans l'air et dans l'eau.
2. Les chaînes latérales hydrocarbonées avec des groupes polaires tendent à reposer à plat sur la surface air/eau à moins qu'elles soient entourées par des résidus d'acides aminés hydrocarbonés, dans un tel cas elles sont montées dans l'air. Ses chaînes latérales isolées montrent le même effet à de faibles pressions de surface.

3. Si la chaîne latérale $-(CH_2)_2CO_2^-$ est ionisée elle ne peut alors s'échapper complètement de la phase aqueuse. Les facteurs favorisant une immersion complète sont: une faible concentration de sel, des fortes pressions de surface (des surfaces faibles), et la présence de groupements volumineux comme les cycles benzéniques à l'interface. Par contre, une faible pression, des fortes concentrations de sel, et l'absence d'autres groupements dans la surface favoriseront un repli dans lequel les chaînes transportant les groupes terminaux ionisés reposeront à plat à l'interface.

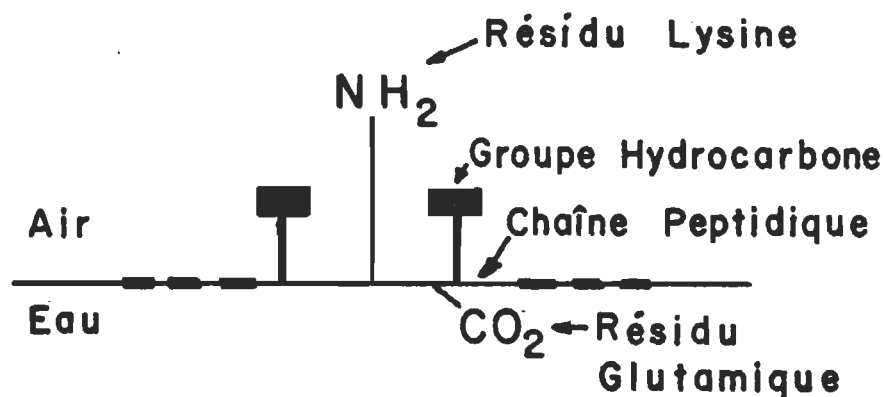


Schéma 2. Représentation de l'orientation d'une chaîne polypeptidique à l'interface air/eau.

Davies, J.T. (1954) suggère fortement qu'il y ait autour de chaque résidu de lysine dans les protéines une concentration locale relativement grande, des chaînes latérales hydrocarbonées, et qu'à la surface elles sont responsables de la montée des groupes NH_2 dans l'air (voir schéma #2).

Birdi, K.S. (1972) a représenté l'étalement des protéines de la façon suivante:

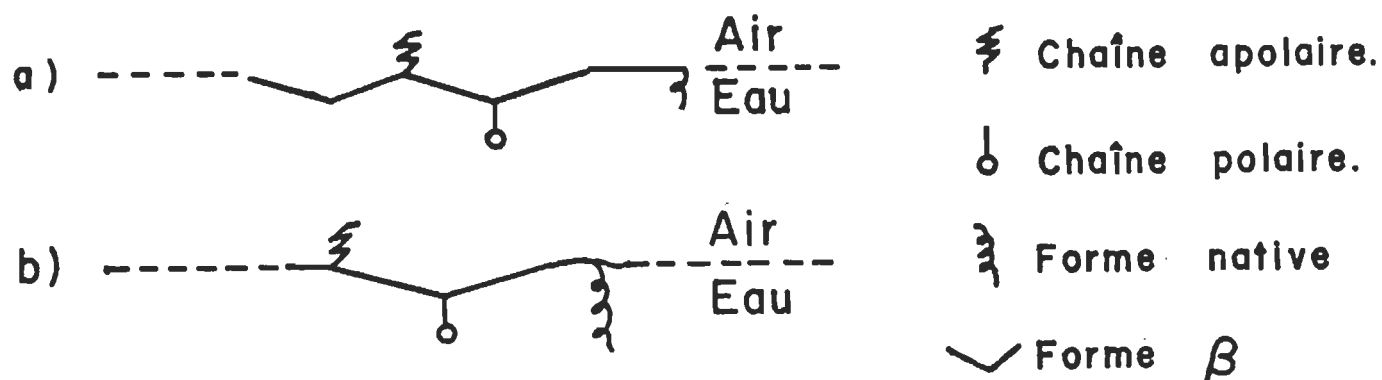


Schéma 3. Représentation schématique d'une molécule de protéine à l'interface air/eau a) complètement étendue b) partiellement orientée.

Birdi, K.S. (1973) suppose que la faible solubilité des protéines favoriserait sa configuration β qui est formée des liens hydrogènes intermoléculaires. Ce dernier ne négligea pas toutefois les considérations apportées par Cheesman, D.F. et coll. (1954).

En fait, les représentations sont presque toutes identiques et les auteurs s'accordent sur la disposition des groupements de sorte que la protéine soit plus ou moins à plat sur la surface.

C'est à la suite d'expériences de dénaturation de la protéine par une forte agitation, une augmentation de la température ou à concentration d'urée élevée que l'on a déduit certaines conclusions sur l'état de la protéine à l'interface air/eau. Puisqu'elle n'est pas dénaturée il y a donc une caractéristique des protéines qui fait que certaines d'entre elles sont plus ou moins stables. En fait il s'agit de la forme globulaire de la protéine. De là on sait qu'elle sera plus ou moins flexible selon sa configuration donc plus ou moins stable. Si la protéine est très compacte elle

sera très stable à l'interface air/eau puisque les interactions protéines/protéines seront plus faibles contrairement à une protéine très étendue à la surface. Dans ce cas, il y a possibilité d'ionisation plus grande donc interaction plus grande.

Guastalla, J. (1938) a démontré théoriquement et expérimentalement que la loi de Mariotte s'applique aux gaz en deux dimensions, tout au moins aux dilutions extrêmes. La loi de Mariotte s'exprime comme suit:

$$(1) \quad FA = KT$$

F: pression du film

A: surface à la pression indiquée

K: constante de Boltzmann

T: température absolue

Ce principe assure qu'il n'y a aucune force de répulsion entre les molécules ce qui est vrai en pratique pour $F \xrightarrow{\rightarrow 0}$ ou $A \xrightarrow{\rightarrow \infty}$. Pour les gaz superficiels provenant des corps gras la relation des gaz parfaits est valable dans un domaine plus ou moins grand. La réalisation pratique d'un film à dilution infinie est difficilement réalisable. Les approximations apportées en dérivant l'expression idéale entraîne des erreurs appréciables à des pressions plus petites que 1×10^{-5} newton/cm (dyne/cm). La dimension des molécules formant le film est une importante source d'erreur, puisque les déviations cinétique et thermodynamique de l'équation (1) nécessitent que la surface occupée par les molécules soit négligeable. Cette idéalité est peu probable, surtout lorsque la surface du film d'un polypeptide est réduite à quelques milliers Å²/molécule. A ce moment, les molécules commencent à interagir, en particulier dans le cas des protéines qui sont moins compressibles. Cette particularité peut s'expliquer

par une co-surface et on peut alors écrire la loi sous cette forme:

$$(2) F(A-A_0) = KT$$

A_0 : surface occupée par chaque molécule dans le film condensé

Cette relation donne de bons résultats pour un film à l'interface huile/eau mais dans le cas d'un film à l'interface air/eau cette équation n'est pas valable, ceci du fait qu'en pratique les déviations pour les monocouches électriquement neutres sont invariablement négatives à de faible pression, quoique l'équation (2) nécessite que FA soit plus grand que KT . Les solutions supposément idéales dérivent du traitement de l'équilibre thermodynamique de la pression osmotique. Beaucoup de changements semblent attribuables aux attractions inter-moléculaires et plusieurs formules permettent de réduire l'importance de ces interactions ou de les rendre nulles, telles que:

$$(3) F(A-A_0) = g KT$$

g : constante plus petite que l'unité (environ 0.7)

Dans un autre cas il a été rapporté que FA , à des surfaces très grandes, ne tende pas vers KT mais plutôt vers $1/2 KT$, ce qui résulterait de l'association des molécules sous forme de dimères.

Malgré ces différents problèmes, Guastalla, J. (1939b) et Bull, H.B. (1945a) calculèrent le poids moléculaire (P.M.) directement de la formule (1) en incluant dans cette formule, le nombre de moles n :

$$(4) FA = n RT$$

n : nombre de moles

R : constante des gaz parfaits

Le poids moléculaire est alors obtenu de l'interception sur l'axe des ordonnées du graphique FA en fonction de F, si les forces inter-moléculaires sont négligeables pour les résultats obtenus.

Guastalla, J. (1939b) traça c/F en fonction de la concentration en mg de protéine par m^2 de surface à partir de l'équation:

$$(5) F \left(\frac{1}{c} - \frac{1}{c_0} \right) = \frac{RT}{M}$$

c : concentration (mg/m^2)

M : poids moléculaire

Puisque cette dernière est une fonction linéaire de c/F , à la limite lorsque $c \rightarrow 0$, nous obtenons:

$$(6) M = RT \left(\frac{c}{F} \right)_{c \rightarrow 0}$$

Donc en extrapolant $c \rightarrow 0$ Guastalla détermina le poids moléculaire du film de la loi des gaz parfaits. Le graphique obtenu demande une très grande précision dans la mesure de faible pression de surface et c'est pourquoi il a mis au point un système lui permettant de telles lectures. Malgré cet avantage le fait de tracer c/F en fonction de c réduit de beaucoup la marge des résultats. Par exemple, pour l'albumine d'oeuf il doit travailler à des concentrations variant de 0.7 mg/m^2 à 0.83 mg/m^2 pour des pressions variant de 0.1 à 1×10^{-5} newton/cm (dyne/cm). Le fait de tracer FA en fonction de F permet d'obtenir beaucoup plus de points expérimentaux de 0.1 à 1×10^{-5} newton/cm (dyne/cm).

L'étude des polymères hautement polymérisés (Huggins, M.L. (1942)) a ouvert une nouvelle approche de la chimie-physique des protéines. La théorie mathématique pour l'application des films de protéine à l'interface air/eau fut principalement développée par Singer, S.J. (1948) et par Davies,

J.T. (1954). Ils suggèrent que la pression du film à n'importe laquelle surface dépende des facteurs suivants:

x : le degré de polymérisation pour un polymère et dans le cas d'une protéine le nombre de résidus d'acides aminés dans la molécule

a_L : aire limite d'un acide aminé

A_0 : pente du graphique de FA en fonction de F

T : température absolue

Z : nombre de coordination de l'arrangement géométrique régulier des résidus d'acides aminés sur la surface

La relation développée de ces identités peut être représentée sous la forme simplifiée suivante:

$$(7) F = \frac{KT}{a_L} \left[-\ln\left(1 - \frac{a_L}{A}\right) + \left(\frac{x-1}{x}\right) \times \frac{z}{2} \ln\left(1 - \frac{2 a_L}{z A}\right) \right]$$

Le terme z est à la base de ce nouveau principe. Il est relié au nombre de positions pouvant être occupées par un segment du peptide en relation avec un segment adjacent. Le nombre de coordination sera réduit si les résidus d'acides aminés forment une chaîne non flexible. Dans le cas d'une chaîne rigide nous pouvons donner la valeur de 2 pour z , tandis que pour une macromolécule flexible z peut être d'environ 4.

Par expansion de la formule (7), négligeant les termes élevés, et assumant que $a_L = A_0 x$, nous obtenons:

$$(8) FA = KT + \frac{a_L}{A} \times xKT \left(\frac{1}{2} - \frac{x-1}{x} \times \frac{1}{z} \right)$$

De l'équation (8) et (2) on peut obtenir la valeur de z :

$$(9) z = \frac{x-1}{x} \times \frac{1}{\frac{1}{2} - \frac{1}{x}} \frac{A_0}{a_L}$$

Ce nombre de coordination (z) peut nous donner le pourcentage de flexibilité selon l'équation suivante:

$$(10) \% \text{ de flexibilité} = 100 \times \left(\frac{z - 2}{2} \right)$$

Le pourcentage de flexibilité pour l'albumine de bovin est de 3.0% à l'interface air/eau et 4.5% à l'interface huile/eau. Pour l'ovalbumine on obtient 0.8% et 22% respectivement à l'interface air/eau ou huile/eau (voir tableau #13 p. 185 en annexe, Cheesman, D.F. et coll. (1954)). Pour z se rapprochant de 2, l'équation (7) devient alors:

$$(11) FA = KT + \frac{1}{2} FA_0$$

Cette formule suggère que sous ces conditions le graphe de FA en fonction de F devrait être linéaire, ce qui est souvent vrai dans le cas des polymères à l'interface air/eau. Si z n'est pas près de 2 l'équation (5) prédit une courbe de FA en fonction de F qui sera fléchie à des pressions supérieures à environ 0.1×10^{-5} newton/cm (dyne/cm). Donc dans le cas de z nous avons toujours FA \xrightarrow{KT} à mesure que F $\xrightarrow{0}$, alors le seul problème est celui des mesures qui doivent être prises à de très faibles pressions de surface.

Pour différents types de molécules les valeurs de z sont les suivantes:

molécule complètement rigide:	$z = 2$
molécule peu flexible: (protéine globulaire à l'interface air/eau)	$z = 2.015$
molécule modérément flexible: (protéine globulaire à l'interface huile/eau)	$z = 2.12$
molécule hautement flexible: (poly-n-butyl-metacrylate à l'interface air/eau; polypeptide à l'interface huile/eau)	$z = 2.3$
molécule en pelotte statistique: (triacétate de cellulose à l'interface huile/eau; poly-n-butyl-acrylate à l'interface huile/eau ou air/eau)	$z = 4$

On constate que pour les protéines la valeur de z varie entre 2.015 et 2.12. Les valeurs de z étant très rapprochées on peut donc faire varier ce paramètre en gardant constant x et A_0 afin de pouvoir faire une étude théorique et comparer avec les résultats expérimentaux (Singer, S.J. (1948)).

De ces différentes relations nous pouvons déterminer le poids moléculaire des protéines soit par l'équation de Bull ou selon la relation de Singer tenant compte de la flexibilité de la molécule. Dans le premier cas nous devons obtenir des mesures expérimentales à de très faible pression de surface. L'étude théorique de Singer, S.J. (1948) a permis de constater que là encore les mesures prises pour les calculs de F doivent être à de très faible pression de surface pour obtenir une relation linéaire pour des forces inférieures à 0.1×10^{-5} newton/cm (dyne/cm).

En ce qui nous concerne nous travaillerons à des pressions variant de 0.001 à 0.111×10^{-5} newton/cm (dyne/cm), donc là où la relation $FA = nRT$ est utilisable. De plus nous emploierons des protéines, qui sont peu flexibles, ce qui favorise l'étalement et la stabilité du film. Dans certains cas cependant, il se peut que la relation ne soit pas utilisable et nous devrons, si le cas se présente, faire une approximation à la loi des gaz en deux dimensions.

But de la thèse

La transformation de l'énergie solaire en énergie chimique se situe au niveau du chloroplaste, siège de la photosynthèse. Dans le chloroplaste, il a été démontré que pour les plantes supérieures vertes et algues, la chlorophylle a est le pigment "antenne" de l'énergie solaire. Les molécules de chlorophylle a absorbent l'énergie électromagnétique et transfèrent cette énergie entre elles par un mécanisme de résonnance de type Förster. Ce transfert a lieu jusqu'à ce qu'il y ait rencontre d'un piège d'énergie où la transformation du quantum s'effectue. Par la suite, l'énergie chimique est utilisée pour la fixation du bioxyde de carbone i.e., la synthèse d'hydrates de carbone.

Afin d'apporter une contribution à la connaissance du piège d'énergie, notre équipe se propose d'examiner *in vitro* différents modèles de piège d'énergie, en particulier les systèmes chlorophylle/quinone, chlorophylle/chlorophylle et chlorophylle/protéine. Quant au complexe chlorophylle/protéine, l'état actuel de nos travaux ne permet pas d'en faire l'étude puisque notre appareillage n'est pas approprié aux molécules de protéine. Le but principal de la présente étude est de construire un type spécial de bain de Langmuir, système qui nous permettra d'examiner ultérieurement le complexe chlorophylle/protéine.

Comme le piège d'énergie est de première importance dans l'unité photosynthétique, nous croyons qu'en déterminer sa nature serait primordial dans la connaissance des étapes primaires de la photosynthèse.

L'appareillage actuel déterminant les courbes de pression de surface présente une sensibilité de l'ordre de 0.1×10^{-5} newton/cm (dyne/cm). Cette précision est utile dans la mesure de propriétés de surface de phospholipides, lipides, alcools à longue chaîne saturée et insaturée (C_{16} et plus). Les courbes de pression de surface de ces composés s'étendent de 1×10^{-5} newton/cm (dyne/cm) à 40×10^{-5} newton/cm (dyne/cm). Dans le cas de protéine, l'étendue serait d'un ordre de grandeur complètement différent, soit 0.001×10^{-5} newton/cm (dyne/cm) à 0.5×10^{-5} newton/cm (dyne/cm).

La construction d'un appareil qui nous permettrait d'obtenir une sensibilité de 0.001×10^{-5} newton/cm (dyne/cm) doit être conçu différemment à ce qui a été fait à date. Nous devons orienter notre étude vers un système de détection électronique. En utilisant des fibres optiques, nous croyons pouvoir obtenir le rendement désiré.

Suite à la construction du nouveau système il sera intéressant de travailler à de très faibles pressions de surface. Dans un premier temps nous déterminerons le poids moléculaire de protéine dans le but de constater si l'ensemble des différentes composantes est efficace dans des conditions expérimentales bien déterminées. On pourra comparer les résultats obtenus avec la littérature et si tout est adéquat nous pourrions alors envisager une étude plus exhaustive pour les protéines à l'interface air/eau.

MATERIEL

MATERIEL

Dues aux extrêmes exigences de l'utilisation des monocouches comme technique de travail, il est nécessaire d'apporter les renseignements adéquats dans le processus à suivre. Il sera donc question dans ce chapitre de l'importance concernant la grande pureté des produits mis en jeu, des principales méthodes de purification de l'eau et du nettoyage des lamelles de verre et de quartz.

Préparation des protéines

Nous nous sommes basés sur les travaux les plus récents et sur les protéines les plus étudiées afin de pouvoir comparer facilement nos résultats expérimentaux. L'interprétation dans la détermination des poids moléculaires, sera donc d'autant plus valable avec notre nouveau montage. Il ne fallait pas négliger l'importance dans la différence des poids moléculaires afin de pouvoir vérifier l'efficacité d'action de l'appareillage dans une marge très étendue. On a donc fait une sélection pour en arriver à cinq protéines principales: l'albumine de bovin, la G actine (muscle de lapin), le cytochrome c (coeur de cheval), l'ovalbumine et finalement la rhodopsine de bovin.

Pour chaque échantillon le degré de pureté est vérifié par électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS). Si la pureté de la protéine n'est pas satisfaisante, on la traite selon les caractéristiques de la protéine, soit a) par précipitation au sulfate d'ammonium, dialyse, recristallisation et lyophilisation; b) par colonne échangeuse d'ions ou séphadex ou c) par colonne d'affinité.

Avant chacun des essais, la concentration est déterminée par la méthode de Biuret (Gornall, A.G., Bardawill, C.J. et David, M.M. (1948)) ou par la mesure de la densité optique à 280 nm. Le type d'appareil employé pour prendre ces mesures est un spectrophotomètre d'absorption Unicam modèle S.P. 1800 dont voici quelques caractéristiques:

Sources:	une lampe à arc au deutérium et une lampe à filaments de tungstène.
Fentes:	Variables entre 0.01 mm et 1.0 mm. Largeur de fente utilisée 0.25 mm (largeur de bande passante 0.8 nm).
Monochromateur:	à réseau, type Ebert F/10, ayant une limite de résolution de 0.1 nm.
Absorption:	4 échelles: 0 - 2, 0 - 1, 0 - 0.5, 0 - 0.2.
Sensibilité:	$\pm 1\%$ sur les quatre échelles. ± 0.5 nm sur la longueur d'onde.
Enregistreur:	Unicam AR 25 - 2 échelles de vitesse sec/cm, min/cm.

Ce spectrophotomètre permet aussi l'étude des propriétés électroniques des molécules à l'état monomoléculaire. Il permet de travailler entre 190 et 850 nm et il fonctionne à double faisceaux. Le balayage se fait manuellement ou automatiquement.

Une dernière méthode pour la préparation des échantillons de protéines consiste à peser un poids précis sur une électrobalance modèle Cahn gram.

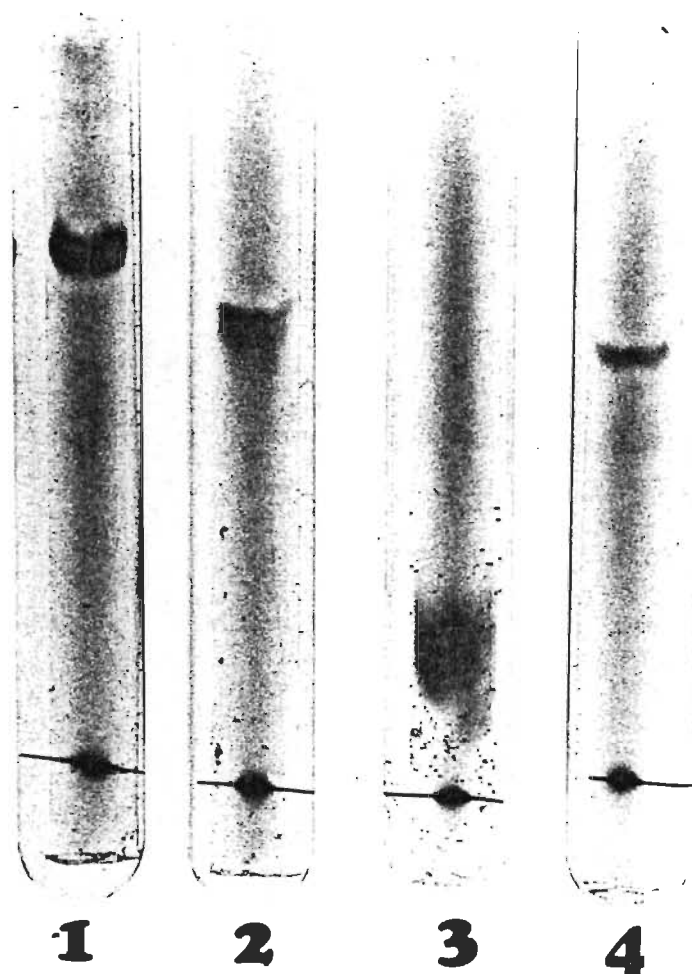
On peut ainsi obtenir une précision de 0.01% sur le poids. Il faut noter que le poids moléculaire n'est pas nécessaire pour le travail que

nous accomplissons puisque toutes les mesures se rapportent à la détermination justement du poids moléculaire. De plus les courbes sont toujours tracées en fonction de la surface occupée par la substance en mètre carré par milligramme déposé à l'interface air/eau.

Albumine de bovin

Cette protéine a été et est encore le sujet de recherches les plus diverses. Bull, H.B. (1947, 1950) l'utilise en monocouche pour la détermination du poids moléculaire. Plusieurs auteurs tels que Neurath, H. (1936), Trurnit, H.J. (1960), Muramatsu, M. et Sobotka, H. (1963), Motomura, K. (1964), Musselwhite, P.R. et Palmer, J. (1968), Blank, M. (1969), Rosano, H.L., Shen, S.H. et Whittam, J.H. (1974) et bien d'autres permirent d'élucider certains problèmes comme l'étalement à l'interface air/eau, le comportement de l'albumine acétylée, l'épaisseur du film protéique, les énergies d'interaction, la viscosité (dénaturation), etc... Ainsi, une grande quantité de travaux nous donnent la possibilité de comparer facilement nos résultats.

L'albumine de bovin que l'on obtient de la compagnie Sigma a une pureté de 99%. L'électrophorèse donne une bande mince (voir schéma #4). On peut donc s'en servir directement sans contamination de surface. Toutefois, on la conserve à -5 degré Celsius et sous vide afin d'éviter l'hydratation.



1. ALBUMINE DE BOVIN
2. OVALBUMINE
3. CYTOCHROME C
4. G ACTINE

Schéma 4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS pour vérification de la pureté des protéines.

G actine (muscle de lapin)

Dernièrement les travaux de Yegiazarova, A.R. et Zaalishvili, M.M. (1972) puis ceux d'Egiazarova, A.R. et Nadareishvili, K. Sh. (1973) apportèrent des résultats intéressants sur le comportement de la G actine à l'interface air/eau.

La préparation de la G actine se fait selon la méthode mise au point par Rees, M.K. et Young, M. (1967). Cette dernière est celle de Straub, F.B. (1951) qui a subi certaines modifications majeures permettant une plus grande purification. D'autres changements apportés par Gruda, J. (1972) nous procurent aujourd'hui la protéine avec une pureté de 99.9%. Comme dans le cas de l'albumine on obtient seulement une bande par électrophorèse (voir schéma #4). La protéine est conservée à 5 degré Celsius dans le tampon approprié soit:

KCl	0.1 M/l	
ATP	0.5×10^{-3} M/l	Tampon phosphate 25 mM à pH 7.0
MgCl ₂	10^{-3} M/l	

On peut la conserver ainsi pendant environ deux semaines selon les études faites par viscosimétrie en présence de phalloïdine, en proportion équimolaire, comme stabiliseur. La présence de phalloïdine n'enlève pas l'activité de la G actine, elle reste native.

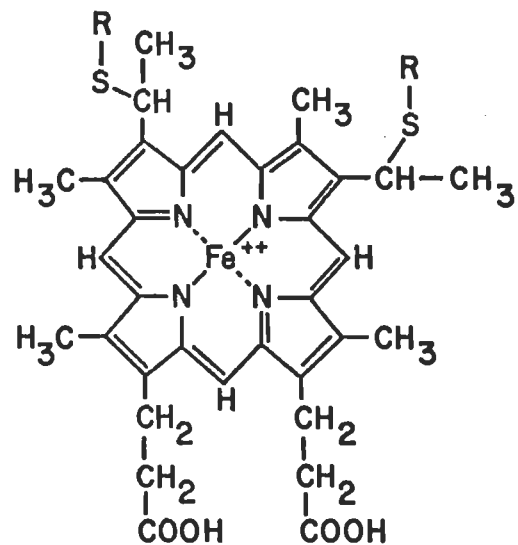
Son poids moléculaire, déterminé en 1973 par l'équipe d'Elzinga, M., Collins, J.H., Kuehl, W.M. et Adelstein, R.S., nous a permis de l'utiliser comme autre source de vérification du montage. De plus il nous a été possible de comparer, en partie, nos résultats avec ceux obtenus par Yegiozarova, A.R. et coll. (1972).

Cytochrome c (coeur de cheval)

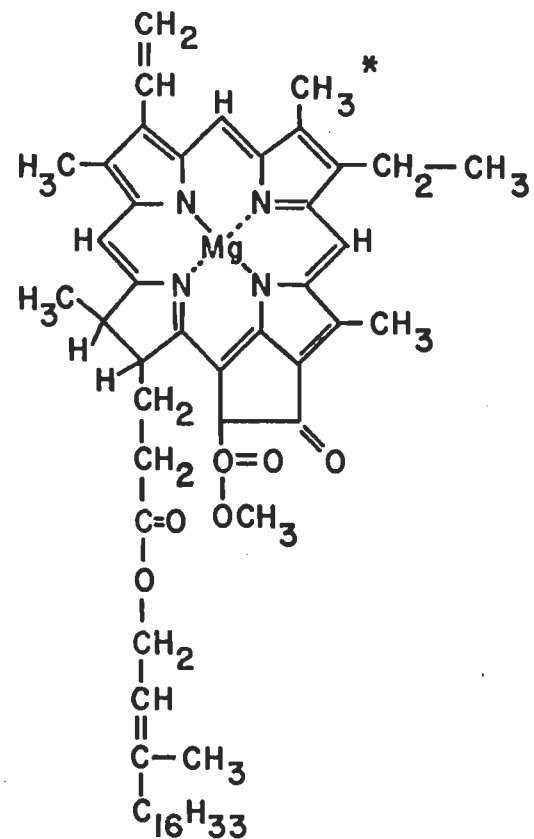
Comme pour le cas de l'albumine elle fut couramment employée dans des études diverses. Le cytochrome c a une grande importance dans la composition des mitochondries et des organelles formées par l'union des mitochondries (Margoliash, E. et Schejter, A. (1966)). De ce fait, cette protéine acquiert une grande importance pour nous qui travaillons sur la membrane cellulaire. Comme elle contient un noyau porphyrrique qui lui donne une certaine ressemblance structurale avec la chlorophylle (voir schéma #5 p.25) il nous apparaît que son choix est justifié.

Les poids moléculaires des cytochromes c ont commencé à être déterminés par la séquence complète des acides aminés en 1961 (Margoliash, E. et coll. (1966), Dayhoff, M.O. et Eck, R.V. (1967-1968)) ce qui facilite certaines parties du travail, en particulier dans les faibles interactions, et permet des interprétations plus plausibles.

Le cytochrome c est obtenu de la compagnie Sigma sous forme de monomère à 90% oxydé. L'électrophorèse nous a donné une seule bande principale comme le démontre le schéma #4 p.22 et deux autres petites bandes très rapprochées de la première donc de faibles impuretés qui sont généralement difficile à enlever. Une purification plus poussée n'a pas changé les propriétés optiques du même type de cytochrome c (Myer, Y.P. (1968)). Il serait donc inutile de purifier cette fraction puisqu'elle semble adéquate à nos besoins.



Hème du Cytochrome c. Les groupements R représentent les chaînes d'acides aminés de la protéine.



* Chlorophylle a d'après Wolken, J.J. (1961)
Le groupe CH₃ est remplacé par un groupement CHO dans la Chlorophylle b.

Schéma 5. Ressemblance structurale entre le hème du cytochrome c et la chlorophylle a.

Ovalbumine

Comme pour l'albumine de bovin, cette protéine se prête bien aux expériences qui demandent une vérification du poids moléculaire. C'est une fois de plus Bull, H.B. qui en 1938 commença à étudier l'état monomoléculaire de l'albumine d'oeuf. Guastalla, J. (1939a) avec un nouveau système a obtenu des valeurs de poids moléculaire avec une précision remarquable. Puis Bull, H.B. (1945a,c, 1950) Mishuck, E. et Eirich, F. (1954), Trurnit, H.J. (1960) et plus récemment Bull, H.B. (1972) continuèrent les recherches sur la détermination du poids moléculaire et de l'adsorption de l'albumine d'oeuf.

L'électrophorèse montre une seule bande de la protéine originale de Sigma (schéma #4 p. 22). Le fait qu'elle soit très stable et ayant un poids moléculaire intermédiaire à celui des protéines précédentes en ont fait un choix excellent.

Rhodopsine de bovin

Contrairement aux autres protéines, le poids moléculaire de la rhodopsine n'est pas connu avec précision d'après les différents résultats obtenus par Hubbard, R. (1954), Shields, J.E., Dinovo, E.C., Henriksen, R.A., Kimbel, R.L., Jr., Millar, P.G. (1967), Heller, J. (1968), Cavanagh, H.E. et Wald, G. (1969), Deamen, F.J.M., De Grip, W.J. et Jansen, P.A.A. (1972) et finalement Lewis, M.S., Krieg, L.C. et Kirk, W.D. (1974). Tous ces auteurs nous donnent des résultats variant de 26,400 à 40,000. Nous avons donc utilisé notre système à faible pression de surface pour déterminer son poids moléculaire.

L'extraction et la purification de la rhodopsine de bovin ont été effectuées par Christophe Kossi, chercheur du Groupe de recherche en biophysique. Considérant que la pureté de la protéine obtenue est très bonne (Kossi, C.N. (1976)), nous l'utilisons en monocouche tout en sachant qu'elle contient environ 0.05% de détergent, suite à l'extraction. La méthode suivie pour obtenir la rhodopsine pure est celle de Kossi, C.N. (1976) qui se base principalement sur les travaux de Bowness, J.M. (1959), Heller, J. (1968), Cavanagh, H.E. et coll. (1969), Shields, J.E. et coll. (1967), Schichi, H., Lewis, S.M., Irreverre, F. et Stone, A.L. (1969) et finalement ceux de Elrey, T.G. effectués en 1971.

Résumé

Comme on peut le constater les cinq protéines retenues ont des unités de masse atomique variant de 12,000 à 70,000 g/mol. Celles ayant un poids moléculaire plus élevé sont rarement pures et souvent très complexes. Une de celles qu'il nous sera possible d'utiliser à l'avenir est la myosine qui est maintenant purifiée par Gruda, J. pour des études sur la contraction musculaire.

En se basant sur les conclusions des chercheurs cités dans cette partie et nos propres constatations nous pouvons utiliser les protéines retenues en monocouche sans crainte de contamination. Cette contamination peut provenir d'impuretés, de dimère, d'une dénaturation ou autres artefacts non identifiables.

A la suite des résultats obtenus dans la purification des protéines et la qualité de celles provenant de Sigma, nous passons à l'étape concernant

les produits qui vont servir aux solutions tampons et nettoyage en général. Tout cela est fait dans le but d'éviter toutes contaminations de la surface active lors des essais à faible et forte pressions de surface.

Donc la fin du chapitre sera entièrement consacrée aux produits et méthodes permettant d'obtenir la plus grande pureté de nos produits.

Produits utilisés

Toutes les manipulations qui ont un rapport direct avec les mesures de pression de surface et les dépositions sur lamelles, de toutes substances organiques, protéiques ou autres, doivent être faites avec une attention particulière.

L'introduction d'impuretés ou de poussières par des agents chimiques ou organiques, en particulier par l'eau, et par les différentes manipulations telles que: pesées, distillations, séparations, tampons, nettoyage... peuvent causer beaucoup d'erreurs dont il est difficile d'en déterminer la nature.

Il est donc d'une importance extrême que toutes les substances soient d'une très grande pureté (99% +) et plus spécialement l'eau dont nous verrons les méthodes de purification dans les pages suivantes. En consultant l'ensemble des ouvrages publiés en monocouche, il nous est apparu très difficile de pouvoir cerner toutes les sources d'erreurs. Dans chacun des laboratoires, les techniques sont mises au point et très peu

décrites dans les publications. Il faut donc utiliser à la base les produits les plus purs. La compilation des produits chimiques, solvants et matériel est présentée dans les deux tableaux suivants.

Tableau 1. Caractéristiques des produits chimiques

<u>PRODUIT</u>	<u>ORIGINE</u>	<u>PROPRIETE</u>	<u>PURETE</u>
Acide arachidique (N-eicosanoïque)	Appl. Sci. Lab. Inc. Fisher Sigma	M.P. 74-76 ⁰ grade. I *	>99 mol/l Haute pureté 99 + %
Acide chlorhydrique (HCl)	Fisher	Reagent grade ACS *	Concentré 36.5 - 37.8%
Acide fluorhydrique (HF)	Fisher	Reagent grade ACS *	Concentré w/w 49 ± 0.25%
Acide stéarique (N-octadecanoïque)	Appl. Sci. Lab. Inc. Sigma	Grade I *	>99 mol/l 99%
Acide sulfochromique	Fisher	Cleaning solution *	Concentré
Acide sulfurique (H ₂ SO ₄)	Delta Sc. Co. Fisher	Reagent grade * Reagent grade *	95 - 98% 95.6 - 96.5%
Adenosine triphosphate (ATP)	Sigma	Grade I *	99 - 100%
Albumine de bovin	Sigma	Cristallisé et lyophilisé	99%
Cément	Fisher	Pyseal ^R Insoluble dans l'alcool et l'eau	
Cholestérol	Sigma	Cristallisé et lyophilisé	>99%

<u>PRODUIT</u>	<u>ORIGINE</u>	<u>PROPRIETE</u>	<u>PURETE</u>
Chlorure de sodium (NaCl)	Canlab	Certified ACS *	99.5%
Cytochrome c (coeur de cheval)	Sigma	Acide modified type * III	90% oxydé 10% réduit
Decon 75 ^R	BDH chemical	Concentré-alcalin	
Dichromate de potassium	Delta Sc. Co. Fisher	Cristalline Cristalline	
Diéthyléther	BDH Chemical	Analar *	>99 mol/l
Eau distillée	(voir texte p.36)		
Ethanol	Fisher	Consolidated alcohol *	Absolu
Ether anhydre	Canlab	Baker analyzed *	99 + mol/l
Ether de pétrole	Canlab BDH Chemical	Certified ACS * Analar *	99 mol/l 7.99 mol/l
G actine (muscle de lapin)	(voir texte p.23)		
Hydroxyde de sodium (NaOH)	Canlab Fisher	Pastilles Pastilles	
Ligroin	Fisher Eastman Kodak Co. N.Y.	B.P. 90 ⁰ -120 ⁰ C B.P. 35 ⁰ -60 ⁰ C	Practical
Méthanol (CH ₃ OH)	Canlab Fisher	Certified ACS * Spectranalyzed *	99.9 mol/l
Nochromix	Godax Lab., N.Y.	Non-chromique	
Ovalbumine	Sigma	Grade VI *	99%

<u>PRODUIT</u>	<u>ORIGINE</u>	<u>PROPRIETE</u>	<u>PURETE</u>
Parafine	Fisher	Dure - P.E. 56 ⁰ C	
Permanganate de potassium	Fisher	Cristalline	
Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	Fisher	Stabilisé	Concentré 50%
1-Propanol	Canlab	Certified ACS *	
Rhodopsine de bovin	(voir texte p.26)		
Tampon phosphate de sodium	Canlab	Monobasique ou dibasique	99%
Tampon trizma base	Sigma	Reagent grade *	99 + mol/l
Tampon trizma HCl	Sigma	Reagent grade *	99 + mol/l
Tampon trizma phosphate	Sigma	Monobasique ou dibasique	99 + mol/l

* La terminologie anglaise a été utilisée dans le cas de ces produits.

Tableau 2. Caractéristiques des appareils et matériels

<u>APPAREIL</u>	<u>ORIGINE</u>	<u>PROPRIETE</u>
Balance hydrophile	Cenco	(voir texte p.60)
Bain à ultrasons	Ultrasonic inst. intern., Inc., New-York	Modèle P-300-15
	Branson Cleaning equip. Co.	Modèle B-220
	Heat Systems- Ultrasonics, Inc., N.Y.	Modèle 5 x 5 x 5
Cellules de quartz	Hellma Canada Ltd, Toronto	Parcourt optique 1.0 cm
Colonne à distiller	Pegasus ind. specialities Ltd., Toronto	Verre industriel Sovirel Colonne à 8 plateaux
Conductimètre	Metrahm Herisau, Suisse	Modèle E365B
Dépolymérisateur	(conception personnelle, voir p.97)	
Electrobalance	Cahn Instruments, Califor- nia.	Modèle Gram Sensibilité: 0.1 ug Précision: 0.01%
Entonnoir et support pour filtration	Millipore, Missisauga, Ontario	Pyrex
Feuille d'or	George M. Whiley, Ltd., England	0.00061 cm x 10.16 cm x 10.16 cm
Fil de torsion	National standard Company, Niles Michigan	Acier inoxydable 0.0127 cm à 0.0381 cm de diamètre
	Fil de guitare, Fullerton, Fender Musical instruments, Californie.	Nickel-chrome, 0.0127 cm à 0.0381 cm de diamètre
	Cenco	Acier 0.0254 cm de diamètre
	Canadian Westinghouse, Co. Ltd.	Tungstène 0.0254 cm de diamètre Molybdène 0.0203 cm - 0.0229 cm et 0.0254 cm de diamètre
Filtres millipores	Millipore, Missisauga, Ontario	Pore de 5u, 0.45u et 0.2u

<u>APPAREIL</u>	<u>ORIGINE</u>	<u>PROPRIETE</u>
Illuminateur	Fisher	5 intensités différentes
Lamelle de quartz	Esco products Co. U.S., New Jersey	0.1 cm x 2.5 cm x 5.1 cm
Lamelle de verre	Otta, Watska, Cie Ltée, Montréal	Pré-nettoyée et prête à être utilisée
	Fisher	0.15 cm x 2.4 cm x 5.0 cm 0.15 cm x 2.5 cm x 7.5 cm
Lyophilisateur	Virtis Res. Equipment Gardiner, New-York	
Mica	Cenco	0.0058 cm x 12.7 cm x 17.8 cm
Moteur	Surplus Center, Lincoln Nebraska	1 RP3M, 1/2 RPM 5 RPM, 12 RPM
	Metermaster, Montreal	12 RPM
	Power Drive, Inc., Québec	Zero-max. 0 - 400 RPM
Mylar	Dupont of Canada Ltd., Montréal	0.000125 cm x 22.0 cm x 28.0 cm
pH mètre	Fisher	Modèle 320
Phototransistor	Futures electronics Corp., Montréal	2N - 5777
Plasma cleaner	Harrick Sci. Corp., New-York	(voir texte p.52)
Seringues	Hamilton Co., California	Capacité 100 ml (0.1 ml)
	Aglar, Burroughs Willcome Co., New-York	Capacité 0 - 2.5 ml \pm 0.001 ml
	Gilmont Instruments Inc., New-York	Capacité 2.5 ml \pm 0.05 ml 0.25 ml \pm 0.01 ml
Source de puissance	Lab. Volt.Bruck Engineering Com. Inc., New-York	Modèle 194
Spectrophotomètre	(voir texte p.20)	
Système à distiller	(voir texte p.40)	
Système de Langmuir	(voir texte p.57)	
Système millipore	(voir texte p.42)	

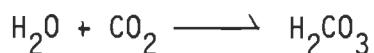
<u>APPAREIL</u>	<u>ORIGINE</u>	<u>PROPRIETE</u>
Teflon	Commercial plastics, Montréal	Tape-Type T et Type 3T 2.54 cm de large x 18 mètre de long (1 côté adhésif)
Tensiomètre de surface	Fisher	Modèle $20 \pm 0.05 \times 10^{-5}$ newton/cm
Thermobalance	Cahn Instruments, California	Modèle RH Sensibilité: 2.0 ug Précision: 0.01%
Transducteur linéaire	Hewlett Packard, Québec	24 DCDT-100
Ultracentrifugeuse	International Equipment Co. Massachusetts	International preparati- ve ultracentrifuge Model B-50
Voltmètre digital	Radionics Ltd., Montréal Syston Donner, Montréal	Automatique, modèle 172 Modèle 7004A

Nous avons donc, dans la mesure du possible, utilisé les produits et appareils qui nous permettent de travailler dans un milieu "libre" de contaminants.

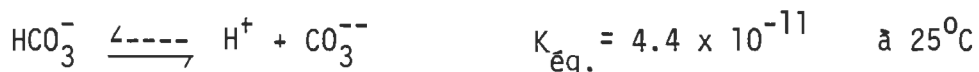
Afin de poursuivre dans le même but, il est donc nécessaire de se servir dans les diverses manipulations de nettoyage, de purification et surtout comme "support" des monocouches d'une eau très pure. Nous verrons ci-après ce que nous avons fait pour en arriver à de bons résultats.

Purification de l'eau

L'eau la plus pure possible doit être utilisée pour la calibration du bain de Langmuir, les courbes de pression de surface, les dépositions sur lamelle et pour la préparation des solutions. Les deux méthodes employées couramment afin de vérifier les critères de pureté de l'eau sont la tension superficielle et la conductivité. Le pH pourrait aussi être un des facteurs mais l'eau transforme le gaz carbonique en acide carbonique:



La dissociation de l'acide carbonique s'effectue comme suit:



(Day, R.A., Jr., et Underwood, A.L. (1967))

Cette dissociation augmente l'efficacité du système tampon carbonate

et bicarbonate, donc régularise le niveau d'alkalinité et ne peut donner un pH neutre. Cette caractéristique nous empêche de l'utiliser comme critère valable pour la pureté de l'eau.

On considère une eau comme étant acceptable en monocouche, si après les différentes méthodes de purification une tension superficielle variant entre 67.0 et 72.0×10^{-5} newton/cm (dyne/cm) est obtenue et une résistivité spécifique >18 megohms cm, cependant cette dernière propriété peut être légèrement inférieure sans entraîner une contamination de la surface active.

Une des premières méthodes de purification de l'eau utilisée dans notre laboratoire fut de prendre une eau préalablement distillée soit d'un système Barnstead ou d'un système Corning - déminéralisateur. Nous avons aussi utilisé l'eau provenant de la compagnie Pepsi-Seven-Up qui employait une méthode de décantation et de filtration pour sa purification. Toutes ces sources d'eau devaient être redistillées dans un système en série fait de Pyrex permettant une tridistillation où aucune manipulation n'est requise avant le prélèvement final. Malgré toutes les précautions apportées, il était impossible d'obtenir une eau avec une tension superficielle supérieure à 66.55×10^{-5} newton/cm (dyne/cm), même si la conductivité diminuait d'une façon appréciable.

Nous devons donc repenser le problème de l'eau. Un équipement nouveau nous permit de faire face à ces divers problèmes. En utilisant l'eau en provenance d'un système millipore type super Q (SQ), puis en la distillant sur une colonne à plateaux nous obtenions couramment une tension

superficielle supérieure à 67.0×10^{-5} newton/cm (dyne/cm). Puis en dernier lieu afin d'éliminer les impuretés produites par un système en Pyrex (SiO_2 , B_2O_3 , Na_2O , Al_2O_3), une dernière distillation dans un système en quartz est utilisée. Cette eau est à toutes fins pratiques considérée comme adéquate pour nos besoins.

Le traitement préliminaire apporté à l'eau, après le système millipore (SQ), est une distillation en présence de permanganate de potassium KMnO_4 1.0 N. Ce dernier sert à oxyder les matières organiques restantes. De l'hydroxyde de sodium 1.0 N, ou de l'acide sulfurique 1.0 N peuvent être ajoutés lors de la dernière distillation pour neutraliser l'eau. Généralement on utilise environ 10 ml de l'un ou de l'autre puis on ajoute des quantités variables selon les besoins.

En ce qui concerne le système en quartz, nous utilisons soit l'eau provenant du système millipore (SQ) ou celle du système à plateaux (Pegasus). L'eau provenant de ce dernier est la plus pure qu'on ait obtenue. Nous pouvons augmenter la tension superficielle de 1 à 2×10^{-5} newton/cm (dyne/cm) en la filtrant avant utilisation sur des filtres millipores superposés de 5.0 u, 0.45 u et 0.20 u.

Cependant, il est possible d'obtenir une eau de même qualité en nettoyant très soigneusement le système millipore (SQ) avec de l'eau javellisée diluée 1 dans 5 et en changeant les filtres par une vérification adéquate du montage.

Avant toutes les expériences sur les bains de Langmuir, des mesures de tension superficielle sont prises. Comme nous utilisons la méthode de du Nouÿ il nous faut réajuster la valeur obtenue par un facteur de correction

que l'on détermine suivant l'expression:

$$F = 0.725 + \sqrt{\frac{0.01452P}{c^2(D-d)} + 0.04534 - \frac{1.679 r}{R}} \quad \text{où } (D-d) \text{ est négligeable dans le cas de l'eau}$$

(Fisher 72)

F: facteur de correction

R: rayon de l'anneau

r: rayon du fil de l'anneau

P: lecture expérimentale

D: densité de la sous-phase

d: densité de la sub-phase

c: circonférence de l'anneau

La tension superficielle est ensuite obtenue de la façon suivante:

$$S = P \times F$$

S: tension superficielle

On peut déterminer plus rapidement la tension superficielle en se rapportant à la courbe de correction du système (Fisher 72). Il est important de calibrer le tensiomètre à l'aide d'un solvant d'une grande pureté comme l'éthanol afin de ne pas introduire d'erreurs dans nos lectures et de permettre une précision de $\pm 0.05 \times 10^{-5}$ newton/cm (dyne/cm). Il est aussi important de connaître la conductivité et de ce fait de calibrer l'appareil de mesure Metrohm Herisau adéquatement.

Afin de comprendre les différents traitements apportés à l'eau, nous donnerons dans les pages suivantes les caractéristiques et la qualité de l'eau obtenue avec chacun des systèmes.

Description des systèmes employés pour la purification de l'eau

Système Barnstead. Ce système d'évaporation comprend une source de chaleur, un condensateur, un dispositif de freinage constant pour enlever les impuretés, une valve de renvoi et un dispositif de contrôle du niveau d'eau et de la concentration de sel dans l'évaporateur. Toutes les surfaces sont étamées et l'eau vient en contact avec celles-ci.

Ce système peut produire une eau ne contenant pas plus de 1.0 ppm de solide. L'eau servant à la condensation est ensuite distillée. Pour 45 litres d'eau de condensation, on produit environ 5 litres d'eau distillée.

Spécifications

capacité (litre/heure)	5
résistivité spécifique (megohm cm)	<0.3
température de l'eau à la sortie (°C)	30 - 35
matières solides totales (ppm)	1.0

Système "Corning Pyrex^R brand glass and Teflon^R (Mega-PureTM)". Ce système est fait entièrement de Pyrex et de teflon afin d'éliminer toutes contaminations par les ions métalliques. Le système comprend une colonne de pré-filtration et une de déminéralisation avant la distillation proprement dite. Il est complètement automatique et a une capacité de 3.4 l/heure. La quantité d'eau nécessaire pour la condensation est d'environ 20 l/heure.

Tout l'ensemble est dans un montage en aluminium et toutes les opérations peuvent être suivies sans changer les pièces de place. Une bouteille

de 75 litres sert à recueillir l'eau.

Spécifications

capacité (litre/heure)	3.4
résistivité spécifique (meghom cm)	<2
solides totaux (mg/litre)	0.34
température de l'eau à la sortie (°C)	30 - 35

Système à triple distillations. Ce système comprend trois ballons de trois litres fonctionnant en séries et reliés les uns aux autres par une colonne contenant des billes de 5 mm de diamètre et un condensateur (Taylor J.E. (1960)). Une mante chauffante à température variable (rhéostat) est utilisée afin de chauffer les ballons. On recouvre les ballons d'un tissu d'amiante dans le but de perdre le moins de chaleur possible et d'éviter que les ballons soient cassés par un trop grand changement de température.

On utilise un débit d'eau d'environ 40.0 litres/heure pour la condensation et les quantités d'eau recueillies sont d'environ 1 - 1.5 litre/heure. On emploie du permanganate de potassium, de l'hydroxyde de sodium et de l'acide sulfurique ce qui permet à la fois d'oxyder les matières organiques, de neutraliser l'eau et d'éliminer les amines.

Pour augmenter la qualité de cette eau on la filtre sur millipore après distillation et ainsi on élimine les particules que l'on retrouve dans le distillat.

Spécifications

capacité (litre/heure)	1 - 1.5
résistivité spécifique (meghom cm)	<15.9
température de l'eau à la sortie (°C)	25 - 30

Système de Pegasus: colonne à plateaux. Ce système est complètement automatique. Il comprend un ballon de 10 litres avec contrôleur d'ébullition contenant l'eau de distillation. Le ballon est relié à une colonne à 9 plateaux à calotte de teflon qui se superpose à des distances d'environ 15 cm. Puis il y a la tête de reflux et de recette électro-pneumatique réglée par une minuterie électronique. Le système de remplissage du ballon à distillation s'effectue avec un dispositif semblable. Un ballon de 2 litres ou de 5 litres sert à recueillir l'eau distillée.

Les quantités d'eau obtenues avec un tel système peuvent varier de 0.1 - 1 litre/heure tout dépendant des temps de reflux et de recette choisis.

Spécifications

capacité (litre/heure)	0.1 - 1
résistivité spécifique (meghom cm)	selon l'eau utilisée 0.1 - 18

Système millipore type Super Q (SQ). Le millipore Super Qtm est un système modulaire pouvant produire une eau d'une pureté extrêmement élevée, exempte de contaminants ioniques, de particules et de microbes. Un degré de pureté supérieur est obtenu en réduisant la grosseur des pores des filtres.

Le système Super Q (SQ) consiste en une suite de quatre cartouches fonctionnant en séries.

A) Le premier élément est une cartouche MF-lifegard^R pour une pré-filtration permettant d'enlever les matières en suspension contenues dans l'eau. On peut augmenter le temps de vie des cartouches organiques et ioniques en plaçant après ce pré-filtre une cartouche Millitube^R MF qui enlève le matériel gélatineux et les fines particules, lesquelles entourent les billes de résine échangeuses d'ions et les granules de carbone. La cartouche MF-lifegard^R est composée de microfibres de verre avec une résine acrylique et incorporée de cellulose de papier dans la filtration initiale. La surface totale de filtration est de 1.02 m^2 et la durée du filtre dépend de la quantité de matières en suspension dans l'eau.

Afin de permettre un temps de vie plus long on rajoute, avant la cartouche lifegard^R, un pré-filtre de cellulose que l'on remplace très souvent.

B) Le second élément est une cartouche Super - Ctm qui adsorbe la matière organique au moyen de charbon activé. La surface de contact des granules étant très grande la cartouche a donc une forte capacité d'adsorption par unité de volume et est déterminée par la surface totale d'adsorbant. La quantité de charbon étant de 4000 grammes et la surface de contact d'environ $1100 \text{ m}^2/\text{g}$ on détermine à l'aide de l'iode la capacité d'adsorption qui est d'environ 1050 mg/g.

Le temps de vie de la cartouche dépend de la quantité de matière organique contenue dans l'eau. Si l'on a des problèmes avec les matières

organiques on place une autre cartouche de charbon activé à la suite de l'autre.

C) Le troisième élément du système est une cartouche échangeuse d'ions. Dans le procédé d'échange d'ions, l'eau contenant les ions est introduite à travers des résines de polymères synthétiques en forme de billes, lesquelles contiennent des cations (H^+) et des anions (OH^-) libres qui prennent part aux réactions chimiques. La colonne mixte permet de neutraliser l'acide formé par les résines anioniques et en même temps la base formée est neutralisée par les résines cationiques. Les deux réactions produisent des molécules d'ions libres dans l'eau.

La cartouche échangeuse d'ions contient 570 cm^3 de résine et une capacité de 2000 grains (ppm $CaCO_3$). La quantité en litres d'eau pouvant circuler est d'environ 1200. La colonne peut être remplacée lorsque la résistivité indiquée sur le Meg-O-Meter est inférieure à celle désirée, soit 18 megohms cm.

D) Le quatrième et dernier élément comprend un millitube ^R MF qui permet d'enlever absolument toutes les particules microscopiques de diamètre supérieur aux pores de la membrane. Cette membrane est composée d'esters de cellulose ou d'un polymère similaire. Le diamètre des pores peut varier entre $0.22\text{ u} \pm 0.05\text{ u}$. Les pores occupent environ 80% du volume total du filtre ce qui entraîne un très haut débit de filtration:

Chaque fois que l'on remplace une cartouche il faut nettoyer le contenant avec une solution javelisante (Javex) à une concentration de 20%. Ainsi on élimine les bactéries qui pourraient éventuellement causer des

problèmes majeurs.

Spécifications

capacité (litre/heure)	60
résistivité spécifique (meghom cm)	>18
température de l'eau à la sortie (°C)	22

Système en quartz Bi-18. Il comprend deux compartiments à distillation continue ayant une capacité de 1.8 litre/heure. La résistivité spécifique de l'eau obtenue est de 18 megohms cm et la température de cette eau à la sortie est de 85°C. L'évaporation de résidus produits par le système est de 0.4 ppm (mg/l). On peut rajouter une colonne à condensation entre les deux distillateurs et une colonne à déminéralisation avant l'entrée d'eau dans le système. Puisque l'on utilise l'eau du système millipore décrit précédemment, on se sert du système en quartz sans ajouter de nouvelles composantes.

Spécifications

capacité (litre/heure)	1.8
résistivité spécifique (meghom cm)	>18
température de l'eau à la sortie (°C)	85
évaporation de résidus (ppm(mg/l))	0.4

Le tableau suivant permet de comparer les résultats obtenus avec chacun des systèmes.

Tableau 3. Récapitulation des résultats obtenus des différents systèmes pour la purification de l'eau

Ce tableau est basé premièrement sur la résistivité spécifique que l'on représente par R en unité megohm cm et deuxièmement sur la tension superficielle représentée par T et dont les unités sont en 10^{-5} newton/cm (dyne/cm). Ces deux critères sont, comme il a déjà été mentionné, les moyens les plus efficaces de vérification.

Eau que l'on utilise pour retraiter dans les autres systèmes			Traitements supplémentaires							
			1		2		3		4	
			Système à triple distillations		Colonne à plateaux		Système en quartz		Filtration sur millipore	
	T	R	T	R	T	R	T	R	T	R
Eau du système Barnstead	63.36	4.78	66.51	6.75	—	—	—	—	68.20	6.75
			—	—	65.05	14.93	—	—	66.40	14.93
Eau de la Compagnie Pepsi	58.02	0.05	60.72	1.9	—	—	—	—	61.80	1.9
Eau du système déminéraliseur	65.56	9.81	66.16	17.70	—	—	—	—	67.00	17.70
			—	—	66.55	16.67	—	—	67.00	16.67
			—	—	66.55	16.67	67.30	17.53	67.35	17.53
Eau du système millipore	67.36	>18	67.50	>18	—	—	—	—	67.50	>18
			—	—	65.75	16.67	68.00	>18	68.00	>18
			—	—	—	—	68.20	>18	68.20	>18

Les traitements par les systèmes 1, 2, 3 et 4 peuvent être consécutifs. La flèche dans un carreau vide indique que l'étape a été passée pour prendre la suivante.

Si l'on compare les différentes qualités d'eau il est évident que celle obtenue par un système millipore, sans traitement supplémentaire, dépasse les qualités standard de celles de tout autre système utilisé.

Suite aux différentes étapes de purification on constate que l'eau du système millipore que l'on distille ensuite dans un système en quartz permet d'obtenir la meilleure qualité d'eau dans notre laboratoire.

En conclusion, nous considérons donc la dernière méthode comme prioritaire. Nous vérifions régulièrement la qualité des filtres millipores dans le but de garder constante la qualité de l'eau que l'on peut en obtenir.

Nettoyage des lamelles de verre et de quartz pour dépositions

Une des techniques employées pour l'étude des différentes substances permettant aux molécules d'être dans un état organisé est la déposition sur lamelles. Cette technique fut principalement décrite et mise au point par les nombreux travaux de Langmuir, I., Schaeffer, V.J. et Sobotka, H. (1937) dans les années 1930.

L'une des difficultés principales de cette méthode est le nettoyage de la surface de déposition qui, selon sa composition et la substance à déposer, doit être traitée différemment.

Le type de verre le plus couramment employé au laboratoire est du borosilicate ou aluminosilicate. Il est composé de 81% SiO_2 , 13% B_2O_3 ,

4% Na_2O et de 2% Al_2O_3 . Ce verre résiste très bien à l'eau, aux solutions neutres et acides, aux acides forts et à leurs mélanges, ainsi qu'au chlore, au brome, à l'iode et aux substances organiques (Goldfinger, G. (1970)).

Par l'action de l'eau et des acides, seules les particules réduites, particulièrement les ions monovalents, sont éliminés du verre par dissolution. Ainsi il se forme sur la surface du verre une couche de gel de silice très mince, peu poreuse, qui rend les attaques ultérieures plus difficiles. Des tests effectués en laboratoire ont démontré que ce type de verre est très résistant à l'eau et à l'acide chlorhydrique. Par contre il est moyennement soluble dans les solutions alcalines.

Comparativement au Pyrex, le quartz se compose uniquement de SiO_2 ce qui le rend beaucoup plus résistant que le verre de laboratoire aux différents tests. Seuls l'acide fluorhydrique, l'acide phosphorique à haute température ou à forte concentration et les solutions alcalines attaquent, dans un ordre croissant, la surface du quartz.

Le choix des différents détergents employés pour le nettoyage des lamelles est fait de façon adéquate et il faut généralement produire une attaque en surface, ensuite déloger les particules puis sécher les lamelles.

Une surface peut être considérée comme propre pour une application mais ne peut pas l'être pour une autre (Zief, M. et Speights, R. (1972)).

Traitements préliminaires

Les lamelles de verre et celles de quartz sont traitées de la même façon. Dans ce qui suit il sera question des méthodes utilisées pour le nettoyage.

Sulfo-chromique chaud ou froid. Cette technique est l'une des plus vieilles utilisées pour le nettoyage des différents types de verre. La préparation de la solution se fait de la façon suivante:

50 g. de dichromate de sodium, ajouter 30 ml H_2O , brasser soigneusement. Compléter à 1 litre avec de l'acide sulfurique concentré que l'on ajoute par portion de 50 ml et très lentement. Brasser sans arrêt.

On peut aussi acheter le mélange, "Cleaning solution", de différentes compagnies (voir tableau #1, p.30).

Après on dépose les lamelles sur un support puis on les trempe dans le sulfo-chromique froid ou chaud pendant une période de temps pouvant varier de 7 heures à 20 heures. Suivant cette étape on doit rincer soigneusement les lamelles afin d'enlever le surplus d'ions bichromates qui se sont fixés à la surface. Si le traitement est insuffisant, on doit changer de méthode ou compléter avec celles qui vont suivre.

HCl dilué - HNO_3 dilué. En employant l'acide chlorhydrique ou l'acide nitrique on considère la méthode comme douce. C'est-à-dire que l'attaque du verre est très faible et on utilise dans ce cas les lamelles de

première qualité et neuves. Il faut parfois prendre des acides plus forts pour déloger les contaminants du verre de moindre qualité et sur des lamelles vieilles.

On place les lamelles sur un support que l'on plonge dans une solution diluée HCl ou HNO_3 pendant environ 4 à 5 heures. Le délogement doit se faire lentement car une concentration trop forte ne fait qu'attaquer inutilement la surface. Par cette méthode on enlève par dissolution les ions monovalents donnant une surface de gel de silice très mince, peu poreuse protégeant ainsi la surface.

Si l'acide nitrique concentré est utilisé, après un bon nettoyage, il peut permettre une plus forte concentration en surface de SiO_2 et rendre ainsi la lamelle plus résistante.

$\text{H}_2\text{O}_2 - \text{H}_2\text{SO}_4$. Dans le cas où les acides faibles ne suffisent pas, on utilise des acides forts. Ceux-ci sont très réactifs avec la surface délogant les impuretés et malheureusement attaquent la surface de façon irréversible.

Afin d'éviter une trop grande attaque, on emploie le peroxyde d'hydrogène 50% et l'acide sulfurique concentré dans un rapport 1:1 mais on trempe les lamelles seulement 10 à 20 minutes dans cette solution.

De façon générale, cette technique est très employée mais la lamelle doit subir un traitement supplémentaire afin de la rendre uniforme selon les besoins.

HF - H₃PO₄. L'acide fluorhydrique ainsi que l'acide phosphorique sont des acides qui attaquent fortement les lamelles. Dans ce cas, il y a cassure du tétraèdre SiO₂ dû à une attaque trop forte et la surface devient alors rugueuse et moins résistante aux attaques ultérieures.

On emploie donc de l'acide fluorhydrique 2 - 3% puis l'on plonge les lamelles environ 10 minutes. Ensuite on les rince avec de l'eau pure à pH contrôlé permettant de réduire les cassures de surface.

L'acide nitrique utilisé après un traitement au HF produit un verre de type Vicord. Ce dernier est très résistant et a une surface très propre.

Acide non-chromique. Ce nouveau produit se mélange à l'acide sulfurique concentré et permet d'obtenir des lamelles libres d'ions chromiques.

On utilise un sachet de 100 grammes pour 2.5 litres d'acide concentré. On dépose les lamelles dans la solution qu'on laisse réagir pendant environ 1/2 heure. La réaction se fait à froid mais on peut aussi la faire à chaud ce qui demande des précautions supplémentaires.

La solution est active pendant environ 5 jours et on peut après cette période rajouter un autre contenant du produit à l'acide déjà utilisé. Dans le cas où la coloration de la solution est brune-jaune, il faut alors jeter le tout et refaire une nouvelle préparation.

Produit alcalin. Les produits alcalins comme Décôn^R et Alconox^R réagissent fortement avec la surface de contact et laissent une pellicule

savonneuse qui doit être enlevée. Il n'est pas toujours facile de nettoyer à la perfection ces détergents et l'on doit en premier lieu rincer abondamment les lamelles. A la suite de cette première étape on vérifie la qualité des lamelles et si elles ne sont pas adéquates on utilise ensuite le "plasma cleaner" et/ou les ultrasons. On peut par ces moyens enlever les dernières substances ayant pu s'infiltrer dans le réseau cristallin de la surface.

"Plasma cleaner" - Ultrasons. A la suite des différentes méthodes de nettoyage aux acides, on peut employer le "plasma cleaner" ou les ultrasons soit avant ou après les acides ou tout autre solvant.

Le "plasma cleaner" utilisé dans notre laboratoire est fabriqué par la compagnie Harrick Scientific Corporation.

Caractéristiques

Radio fréquence:	Table variable pour la décharge de gaz.
Vide:	Enveloppe de 7.6 cm de diamètre avec valve d'ajustement pour entrée de gaz et contrôle de la pression avec connection à l'arrière pour la pompe à vide.
Sélecteur de puissance:	Permet de changer le niveau de puissance dans le but d'augmenter ou de diminuer la chaleur d'opération. Position 1 - 13 watts, 10 - 16 watts.

Le "plasma cleaner" consiste à exposer la substance à une décharge de gaz permettant d'enlever les contaminants organiques des surfaces. On peut introduire différents gaz, soit l'argon, l'azote, l'oxygène ou l'air puis ajuster la pression à 13.33 - 26.66 Pa. Quelques minutes d'exposition

sont suffisantes pour nettoyer la surface mais tout dépend du contaminant.

Une autre méthode permettant de déloger les contaminants est d'employer les ultrasons. Nous avons utilisé deux types d'appareils, l'un de la compagnie Heat-Systems-Ultrasons Inc., l'autre de Branson-cleaning Equipment Company.

Ce dernier est le plus simple d'utilisation et le moins encombrant. Les ultrasons employés sont de haute fréquence (50 - 55 kHz) générée par un transmetteur électronique. Les ultrasons produisent des millions de bulles microscopiques lesquelles se dilatent rapidement et se brisent dans les cavités en agissant comme des milliers de brosses miniatures entraînant le liquide de lavage, faisant ainsi "sauter" les résidus et les accumulations. En fait, l'effet des ultrasons est d'accélérer le processus chimique pour dissoudre les particules ou de déloger les particules ne pouvant réagir chimiquement.

On peut employer comme solutions de lavage soient de l'eau pure ou mélangée à des réactifs, ou bien des solvants tels que l'éther de pétrole, l'acétone ou autres.

Le seul inconvénient de cet appareil est la haute fréquence qui ne peut être tolérée par l'oreille humaine.

Le détergent mélangé à l'eau peut être non seulement un liquide mais une poudre. L'eau est par contre préférée dû à sa stabilité et n'entraîne pas de problèmes ultérieurs. Les détergents et les solvants organiques doivent être utilisés dans le cas de substances telles que graisses,

huiles, protéines, etc... .

Une autre caractéristique du bain ultrasonique est le chauffage de la solution nettoyante ce qui permet une action plus rapide.

Le bain ultrason et le "plasma cleaner" peuvent être employés après les différentes techniques de nettoyage par les acides ou les bases. Chacune des méthodes doit être utilisée selon les besoins en considérant la substance à déloger et la qualité de lamelle désirée.

Séchage. L'un des problèmes qui n'est pas toujours facile de résoudre est le séchage avant utilisation. Dans la majorité des cas, les lamelles sont séchées à l'étuve à 500°C afin d'éliminer toutes traces d'eau qui diminuent la force d'adhésion entre la lamelle et le film à déposer. D'autres moyens comme le séchage par solvant tel que l'éther sont utilisés puis les lamelles sont essuyées avec du papier lentille. On peut aussi par un jet d'air chaud ou froid sécher les lamelles.

Il est plus que certain qu'un séchage à chaud est beaucoup plus efficace pour enlever l'eau mais il reste quand même un petit désavantage soit celui du craquage de la surface si le refroidissement est trop rapide.

La conservation des lamelles après nettoyage des surface et avant le séchage se fait habituellement en les laissant dans l'eau pure jusqu'à utilisation ou en les plaçant dans une solution 0.1 N d'hydroxyde de sodium. Ces dernières cependant doivent être rincées avec de l'eau tridistillée avant séchage.

Traitement des lamelles après le nettoyage et le séchage

Lorsque le nettoyage et le séchage sont complétés, on ne peut considérer la surface des lamelles comme étant uniforme. C'est surtout l'attaque par les réactifs sur le réseau cristallin ou sur les différents ions incorporés au verre qui cause les imperfections et qui laisse des particules de verre à la surface. Les lamelles qui sont utilisées deviennent, après un certain temps, inutilisables dû à leur trop grande irrégularité.

Une lamelle fraîchement nettoyée doit avoir les caractéristiques suivantes: hydrophile et chimiquement inerte. Suivant les propriétés désirées de la surface de la lamelle, on la traite en utilisant l'une ou l'autre des méthodes décrites précédemment. Ces lamelles doivent être traitées différemment.

Plusieurs techniques permettant de rendre la surface régulière de la lamelle, soit hydrophile ou hydrophobe, ont été clairement décrites dans les travaux de Blodgett, K.B. et Langmuir, I (1937), Alexander, A.E. (1939), Pethica, B.A. (1954), Froines, J.R. (1967) et par celui de Leblanc, R.M. et Orger, B. (1970).

Il n'est pas tout de savoir nettoyer convenablement les différents types de lamelles mais il faut aussi savoir si elles sont bien nettoyées.

Afin de constater si la surface est propre, on peut employer différentes méthodes:

- prendre le spectre infra-rouge,
- mesurer l'angle de contact avec l'eau,
- déposer une goutte d'eau sur sa surface et voir si elle s'étend uniformément et devient invisible.

La dernière méthode permet de constater rapidement si les surfaces sont libres de contaminants organiques.

Le but de la présente partie, "nettoyage des lamelles de verre et de quartz pour dépôts", est de donner un aperçu de notre expérience dans la préparation des lamelles servant de support solide aux monocouches. La propreté de ce support est de première importance dans les études spectroscopiques des pigments orientés à l'interface air/solide. Dans le futur, nous prévoyons la déposition de protéines à l'état monomoléculaire sur une lamelle pour examiner la nature de l'interaction inter et intramoléculaire. On pourrait étendre cette étude aux interactions lipide-protéine à l'état de couche bimoléculaire située à l'interface air/solide. Les spectroscopies électronique et infra-rouge se prêteraient bien à cette étude.

MONTAGE DE SYSTEMES BASES
SUR LE PRINCIPE DE LANGMUIR

MONTAGES DE SYSTEMES BASES SUR LE PRINCIPE DE LANGMUIR

Les systèmes utilisés sont tous conçus de la même façon i.e., ils comprennent un bain pour l'étalement de la monocouche à l'interface air/eau, un flotteur de mica, de teflon ou de milard rattaché aux parois du bain par deux feuilles d'or, puis un mécanisme de détection permettant de mesurer la pression de surface. En fait, la conception originale de cet appareil est de Langmuir, I. (1920) et par la suite plusieurs auteurs tels que Guastalla, J. (1939a), Anderson, K.J.I., Stenhagen, S.S. et Stenhagen, E. (1944), Anderson, P.A. et Evett, A.A. (1952), Trurnit, H.J. et Lauer, W.E. (1959), Mann, J.A., Jr. et Hansen, R.S. (1960), Gaines, G.L., Jr., (1963), Suzuki, A., Ikeda, S. et Isemura, T. (1967), Vroman, L., Kanor, S. et Adams, A.L. (1968), Pagano, R.E. et Gershfeld, N.L. (1972), Fromherz, P. (1975), ont apporté différentes modifications permettant à la fois de faciliter les méthodes de mesures et d'augmenter leurs précisions.

Dans un premier temps, je vais traiter du système conventionnel i.e., celui permettant de prendre des mesures à forte pression de surface, 1 à 40×10^{-5} newton/cm (dyne/cm). En second lieu, il sera question de notre propre conception d'un nouveau système dont l'échelle de travail se situe à faible pression de surface soit de $0.001 - 0.111 \times 10^{-5}$ newton/cm (dyne/cm) et qui est le but de ce manuscrit.

Système à forte pression de surface

Afin de pouvoir étudier plus en détail tous les aspects se rapportant à l'état des protéines à l'interface air/eau et d'en arriver à la détermination de leur poids moléculaire, il est d'une importance capitale de travailler à forte pression de surface puis de passer à une étude à faible pression de surface.

L'avantage du système à forte pression de surface est de nous permettre de déterminer si notre protéine se comporte de façon idéale à l'état monomoléculaire. Dans l'affirmative, on élabore alors davantage notre recherche en complétant les travaux avec le système à faible pression de surface. Nous verrons en détail son principe de fonctionnement dans la seconde partie de ce chapitre.

Méthode du cadran gradué en degrés

L'appareil utilisé a été adapté pour nos propres expériences et fabriqué dans nos ateliers (schéma #6 p.60):

Caractéristiques

Un bain principal

longueur	(cm)	33.0
largeur	(cm)	14.8
hauteur	(cm)	5.0

Il est assemblé avec du verre de 0.50 cm d'épaisseur et chacune des parties est collée ensemble par de la colle silicone non toxique. Afin

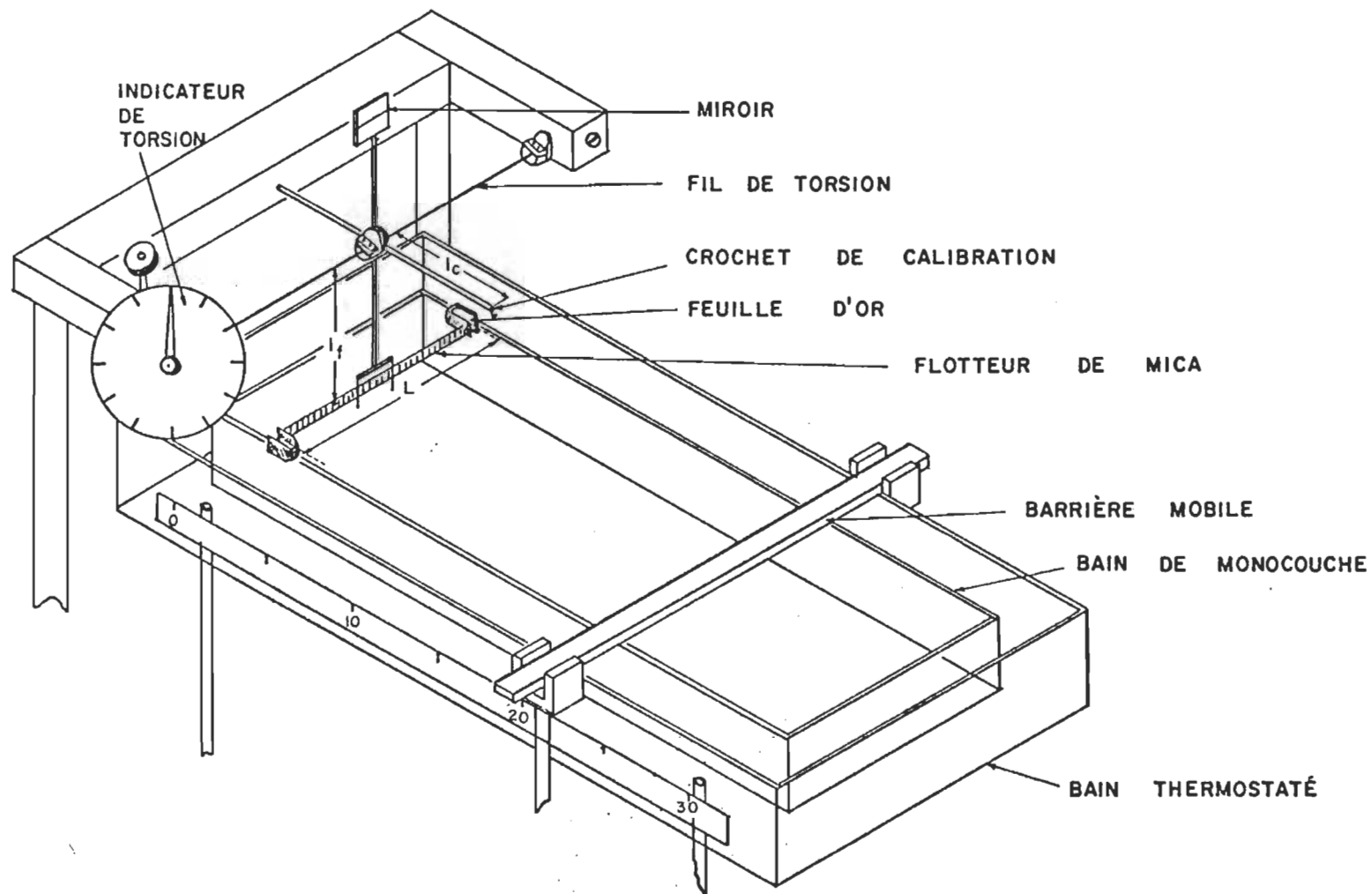


Schéma 6. Bain servant à l'étude des isothermes..

d'éviter que cette substance réagisse avec les produits venant à son contact, on recouvre de teflon l'ensemble du bain de monocouche. Lorsque le teflon semble contaminer (si en enlevant l'eau du bain, il se forme des petites mares dans le fond on considère qu'il y a à cet endroit une contamination) on le change simplement par du neuf. Les parois du bain sur lesquelles la barrière va se déplacer sont aussi recouvertes de teflon permettant ainsi, dû à sa caractéristique hydrophobe, d'empêcher les fuites possibles d'eau ou de molécules se trouvant à la surface. Les fuites se produisent généralement à l'endroit du contact de la barrière mobile et du bain.

Un bain thermostaté

longueur	(cm)	48.0
largeur	(cm)	22.0
hauteur	(cm)	6.4

Ce dernier est monté de la même façon que le bain principal. Une ouverture à la base permet à l'eau de retourner à la pompe de recirculation et de revenir, à température contrôlée par un tube déposé dans le bain. De nouvelles techniques peuvent permettre de contrôler la température de l'eau adéquatement. Une d'entre elles est de placer un serpentin en verre dans le fond du deuxième bain. On remplit ce dernier d'eau puis on fait circuler l'eau à température désirée dans le serpentin. On contrôle à ± 0.3 degré Celsius la température de l'eau du bain supérieur.

Une barrière mobile

longueur	(cm)	22.0
largeur	(cm)	1.2
hauteur	(cm)	0.6

Cette barrière en verre est recouverte d'un film de teflon afin d'être plus inerte et de permettre un glissement plus doux sur les bords du bain. On applique une pression sur cette barrière aux deux extrémités, en plaçant deux poids d'environ 100 g, dans le but d'éviter les fuites possibles aux angles de contact bain-barrière. La mobilité de cette barrière est assurée par un mécanisme spécial (voir schéma #6) qui avance ou recule au moyen d'une vis sans fin de 10 filets par centimètre. Le mouvement peut être actionné manuellement, mécaniquement ou électriquement.

Plusieurs types de moteurs peuvent être utilisés pour le fonctionnement de ce système (voir tableau #2 p.33). Selon le principe utilisé, on peut modifier la précision de nos mesures. En effet, en utilisant un moteur ajusté par un rhéostat, on note que ce rhéostat est sensible aux variations dans l'intensité de la source d'alimentation (ligne) ce qui entraîne une diminution ou une augmentation de la vitesse du moteur. Par contre, si on utilise un moteur synchron, on aura un montage complètement électronique avec élimination à 99.99% de fluctuations possibles.

Un fil de torsion

Il est d'une importance primordiale. Selon qu'il soit en acier, en nickel, en molybdène ou en tungstène et que son diamètre varie de 0.0127 à 0.0381 cm, nous obtiendrons une variation dans la sensibilité de l'ensemble du système comprenant: pureté de l'eau, température de l'eau et de la pièce, feuille de mica, feuille d'or, balancier, diamètre du fil de torsion. On doit dans les manipulations ultérieures éviter de tordre le fil avec une trop grande déviation qui pourrait déformer ce dernier et

changer ses propriétés physiques (module de Young). La tension exercée aux extrémités du fil doit être adéquate car si elle est trop forte, il peut en résulter un étirement du fil et par voie de conséquence changer la sensibilité. La mesure de la torsion du fil se fait en degré par un mécanisme situé à l'une des extrémités d'attachement du fil.

Un balancier

Ce dernier est retenu au fil de torsion et vissé de telle façon que le bras conduisant aux flotteurs soit situé au centre du bain. Ce bras est relié à une fourchette passant par les deux trous du flotteur de mica, et sa longueur est de 7.9 cm. La fourchette, d'une largeur de 6.4 cm, possède une hauteur de 1 cm du flotteur. Ce premier bras conduit à un miroir situé à environ 7.0 cm au dessus du fil de torsion. Le miroir nous permet d'observer la déviation du faisceau lumineux dû à une pression exercée sur le flotteur ou lors de la calibration. Cette calibration s'effectue en plaçant des poids que l'on a calibré à l'aide d'une électrobalance sur le crochet placé à cet effet. Il se trouve à l'extrémité du bras de levier de 7.3 cm de longueur.

Un flotteur

longueur (cm)	12.7
largeur (cm)	0.8
hauteur (cm)	0.0085
très hydrophobe	

Le flotteur est ordinairement fait de mica mais on peut aussi utiliser soit du teflon ou du mylar. La caractéristique importante du flotteur est qu'il soit très hydrophobe et inerte. Il est rattaché aux parois

du bain par deux feuilles d'or et le tout est collé soit par de la cire ou du ciment. Les feuilles d'or ont les caractéristiques suivantes:

longueur	(cm)	4.0 - 5.0
largeur	(cm)	0.6 - 0.8
hauteur	(cm)	0.0006
très inerte		

C'est afin de permettre une plus grande mobilité au flotteur que ce dernier est relié par des feuilles d'or au bain.

L'ensemble du système est recouvert d'une cage en plexiglass pour protéger la surface des contaminants externes et on a accès à la surface du bain par un couvercle situé sur le dessus. Tout le bain est monté sur une table antivibration. Un système de climatisation et ventilation de forte capacité permet de maintenir la température constante $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ dans le laboratoire.

Sur le côté du bain, il y a une règle graduée qui nous permet de calculer la surface occupée par les molécules à l'interface air/eau.

Principes de la technique des monocouches. Avant de remplir le bain d'eau pure, on procède au nettoyage des parties venant à son contact. Les pièces comme le bain (recouvert de teflon), la barrière, le flotteur et les différents accessoires pour les manipulations sont soigneusement dégraissées avec de la ligroïne et rincées plusieurs fois à l'eau purifiée. Après cette étape, on peut procéder au remplissage du bain avec une solution appropriée.

Chaque fois que l'on effectue le changement des feuilles d'or, lorsqu'elles sont contaminées ou lorsqu'il y a des fuites de leurs côtés, on

prend bien soin de vérifier le système pour s'assurer qu'il n'y a pas de fuite. Pour ce faire on saupoudre à la surface de l'eau une poudre très fine, le stéarate ferrique, que l'on compresse délicatement. On se sert alors d'un faisceau lumineux et l'on éclaire tangentielllement la surface du côté des feuilles d'or et du contact barrière-bain où se produit le plus souvent le glissement des molécules hors de la surface compressée. Le tout s'effectue à la noirceur et on vérifie de la même façon si la surface active est libre de particules de poussière. Dans ce dernier cas, on utilise une et même deux barrières de verre que l'on glisse jusqu'au flotteur puis on procède par succion et avec une pipette pasteur au nettoyage. Il ne faut pas oublier de nettoyer la partie arrière du flotteur et de la barrière afin que la tension superficielle soit identique. Lorsqu'il n'y a plus de déflexion du rayon lumineux quand on approche la barrière à environ 3.5 cm du flotteur, on considère la surface comme propre. Puis on vérifie le niveau d'eau dans le bain. Ce dernier doit être à environ 0.1 cm au dessus des parois du bain. On peut alors étaler la substance à étudier et procéder à sa compression. Pour ce faire, la barrière doit d'abord être à l'extrémité opposée du flotteur puis, on dépose avec une seringue micrométrique la substance qui est dissoute dans un solvant approprié. Les acides gras sont généralement dissous soit dans le diéthyléther, le n-hexane ou l'éthanol. Dans chacun des cas le taux d'évaporation à la surface de l'eau est différent et il faut choisir, selon les conditions expérimentales, celui que l'on préfère (Gaines, G.L. Jr., (1966, 1968)).

La seringue contenant la solution d'acide gras est placée à environ 2 - 3 cm de la surface puis on laisse tomber 0.005 ml à la fois du mélange.

Entre chacune des dépositions, on attend que l'indicateur lumineux revienne en position zéro. A ce moment les molécules occupent le maximum de la surface comprise entre le flotteur et la barrière. On dépose une quantité de substances suffisante pour que chacune des molécules ait une espace limite et que la pression qu'elles exercent sur le flotteur soit nulle.

Les molécules d'acide gras sont des composés amphipathiques c'est-à-dire, qu'elles contiennent à la fois un groupement fortement polaire et un autre fortement apolaire. De telles molécules comme l'acide arachidique ($C_{19}H_{39}COOH$), lorsque mises en présence de l'eau, s'orienteront de façon à ce que seule leur partie polaire soit en contact avec les molécules d'eau. Cela est évidemment dû au caractère dipolaire des molécules d'eau qui interagiront avec les groupes polaires par liaison hydrogène (interaction hydrophile) mais qui n'ont aucune affinité pour les parties apolaires. Celles-ci s'orienteront soit hors de l'eau, ou bien à l'intérieur de micelles (par l'apport d'énergie) puisque ces parties apolaires peuvent interagir entre elles par liaison de van der Waals (interactions hydrophobes). Les protéines ont aussi les mêmes caractères hydrophiles et hydrophobes mais la disposition de ces groupements à l'interface est très complexe.

Les interactions hydrophiles étant beaucoup plus stables que celles hydrophobes, les molécules comme les acides gras ou leur sel s'étendront pour former un film monomoléculaire si elles sont déposées délicatement à la surface de l'eau.

Puis, au fur et à mesure que l'on compresse les molécules, elles se disposent et s'orientent pour former un film monomoléculaire en phase liquide ou solide. L'orientation est fonction du caractère hydrophile et hydrophobe de la substance.

La pression de surface étant la différence entre la tension superficielle de l'eau et celle du film monomoléculaire, elle variera donc avec l'aire moléculaire de cette monocouche. L'isotherme de cette pression de surface en fonction de l'aire moléculaire sera caractéristique du composé formant le film.

Dans le cas des protéines la méthode d'étalement est complètement différente. La protéine est soluble dans un tampon donné à la seule condition que l'on respecte le pH et la concentration. Le pH doit être différent du point isoélectrique pour éviter que la protéine se précipite. Mais, puisque nous étalons sur une phase aqueuse, il faut éliminer toute solubilité et pour ce faire, on travaille à pH près du pH_i . La concentration de la solution doit être faible pour éliminer les possibilités d'aggrégation.

On doit donc pour remplir cette dernière condition utiliser des concentrations de l'ordre de 0.04 mg/ml. Il faut employer un volume allant jusqu'à 1 ml afin d'obtenir un nombre appréciable de molécules à l'interface air/eau. Une seringue Aglar ou Guilmond à grande précision est utilisée pour la déposition à la surface de l'eau.

On emploie souvent une forte concentration de sel dans la sous-phase

afin de diminuer l'interaction ionique protéine-protéine.

La technique utilisée pour l'étalement est celle de Trurnit, H.J. (1960). Le schéma #7 nous donne une idée du principe mais de façon plus élaborée, on doit premièrement choisir avec précision le diamètre et la longueur de la tige de verre. On utilise à cette fin le facteur de diffusion déterminé par Jost, W. en 1960.. Le second facteur est la vitesse d'écoulement de la solution à la pointe de la tige qui joue un rôle de premier ordre et que l'on a fixé à 0.2 ml/min d'après les calculs de Trurnit, H.J. (1960). Un moteur à vitesse constante de 5 rpm nous donne un débit constant en tout temps.

C'est avec ces deux principes, caractéristiques de la tige et de l'écoulement, qu'il a été possible d'éliminer la dissolution des protéines dans la sous-phase et de permettre l'étalement le plus uniforme possible. L'état des protéines à l'interface air/eau a clairement été décrit dans l'introduction.

Afin de permettre un étalement plus rapide à l'interface air/eau Stallberg, S. et Theorell, T. en 1939 utilisèrent une solution de protéine 0.03% contenant 50% de n-propanol et de l'acétate de sodium à une concentration de 0.5 M. Cette méthode fut par la suite employée par différents auteurs qui changèrent le solvant organique; on a utilisé de l'alcool isoamylique, de l'alcool isopropylique ou de l'alcool absolu. Les résultats obtenus sont cependant les mêmes (Stallberg, S. (1939)).

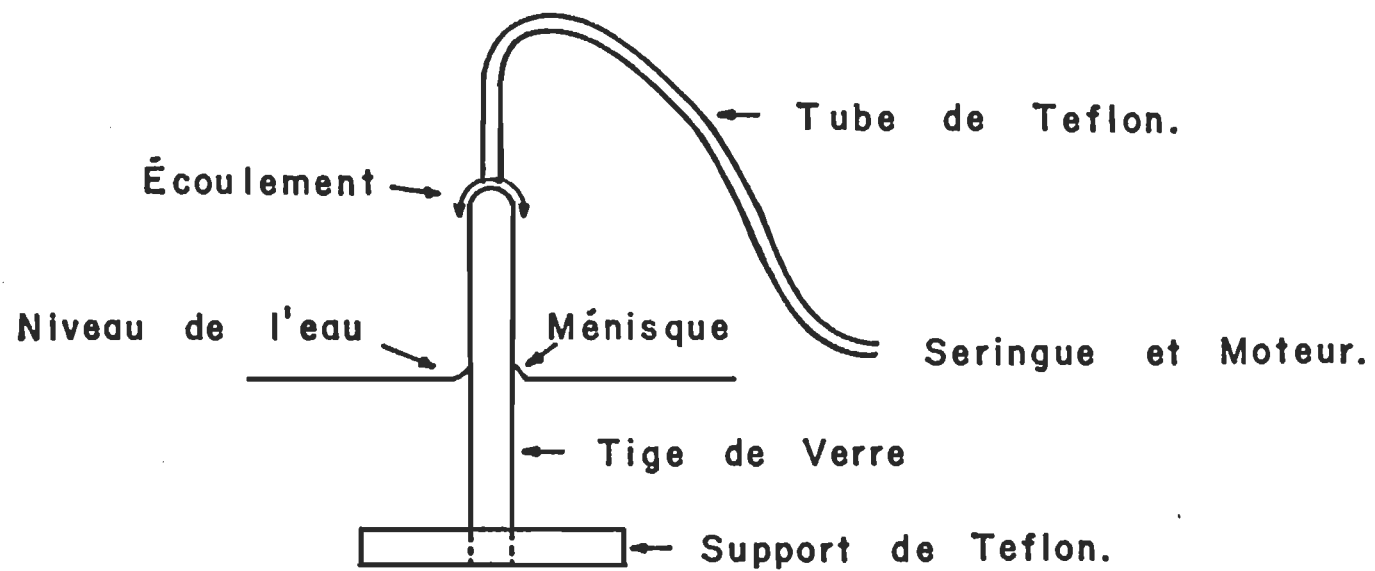


Schéma 7. Représentation de la méthode de Trurnit pour l'étalement des protéines.

Après que l'on ait effectué la déposition de nos molécules et que le faisceau lumineux soit revenu au zéro, on attend de 15 à 20 minutes pour permettre au film de se stabiliser. Enfin on comprime la monocouche en ramenant manuellement ou automatiquement la barrière mobile près du flotteur. La distance finale dépend de l'espace minimum occupée par les molécules.

Il faut éviter une trop forte compression lorsque nous sommes près de l'aire limite afin d'éviter qu'il y ait formation soit de complexes ou de chevauchement moléculaire couramment appelé collapse.

On comprend donc plus facilement maintenant l'importance d'employer des substances très pures et un bon système de mesure car une variation des caractéristiques de surface conduisent à des résultats et une interprétation qui ne sera pas spécifique à la substance étudiée. Nous devons donc, avant de prendre des mesures de pression de surface, nous assurer de la qualité de l'eau et que le système réponde d'une façon correcte. On doit par la suite procéder à l'étalonnage puis à la standardisation.

Etalonnage. Dans le but de connaître la sensibilité du montage, suivant certaines caractéristiques, on utilise un certain nombre de poids calibrés que l'on dépose avec précaution sur un crochet (voir schéma #6 p.60). Auparavant on remplit le bain d'eau pure et l'on nettoie parfaitement la surface entre le flotteur et la barrière mobile de même que celle en arrière du flotteur. La distance barrière-flotteur et flotteur-partie arrière du bain doit être la même.

Lorsque l'indicateur de la pression de surface est au zéro on peut alors commencer la calibration. La force appliquée par le poids sur le

flotteur entraîne une déviation du point zéro sur l'écran, indiquée par la lumière réfléchiée sur le miroir. Pour connaître la force appliquée, on ramène au point zéro sur l'écran en appliquant une force inverse. Cette force est exercée par le fil de torsion et mesurée en degré sur le cadran gradué. Après chacune des mesures, on enlève le poids et l'on ramène le fil de torsion au point zéro dans le but de vérifier si le balancier répond toujours très bien au fur et à mesure que l'on augmente la force appliquée. Il arrive que même en ramenant le fil à zéro le point sur l'écran ne soit pas au zéro. Dans ce cas, une déviation inférieure à 1 degré pour des poids importants est acceptée mais avant d'effectuer une autre mesure, on réajuste le zéro. Après un nombre satisfaisant d'essais, il s'agit de porter graphiquement la force appliquée (poids: P) en fonction de la déviation (degré: θ) exercée. La pente de la droite ($\frac{P}{\theta}$) nous donne la sensibilité (S) du montage. On calcule cette dernière selon l'équation suivante (Gaines, G.L., Jr., (1966)):

$$S = \left(\frac{P}{\theta}\right) \times \frac{g \times l_c}{l_f \times L}$$

S: sensibilité

P: poids

θ : degré

g: facteur de conversion: 980×10^{-5} newton/g
(dyne/g)

l_c : bras horizontal

l_f : bras vertical

L: longueur efficace du flotteur

longueur du flotteur + 1/2 (largeur du bain - longueur du flotteur)

La sensibilité du système est exprimée en newton/cm degré (dyne/cm degré) et est fonction du diamètre du fil de torsion. Une fois cette partie achevée on passe à la standardisation.

Standardisation. Une des méthodes les plus précises qu'on utilise régulièrement pour vérifier le fonctionnement de l'appareillage de monocouche dans son ensemble est de tracer les courbes de pression de surface d'acide gras ou du cholestérol. On emploie plus couramment l'acide stéarique et l'acide arachidique dont les courbes ont été déterminées par différents auteurs tels que Nutting, G.C. et Harkins, W.D. (1939), Leblanc, R.M. et coll. (1970), Cadenhead, D.A. et Osonka, J.E. (1970), Willis, R.F. (1971), Patil, G.S., Matthews, R.H. et Cornwell, D.G. (1972). On connaît à partir de ces données la surface occupée par une molécule en $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ avec précision ce qui nous permet de faire une évaluation rapide de la validité de nos résultats.

Nous avons donc utilisé le cholestérol, l'acide stéarique et l'acide arachidique, tous des produits à un très grand niveau de pureté. Ces composés sont dissous dans du diéthyléther à une concentration variant entre 10^{-3} et 10^{-4} mole/l. On dépose ensuite à la surface 100 μl de la solution sur de l'eau à pH: 2, tamponnée ou sur une solution de chlorure de cadmium (CdCl_2) pour l'acide arachidique. Si les résultats obtenus sont identiques à ceux de la littérature, on passe ensuite aux courbes de pression de surface des protéines.

Courbes de pression de surface. Dans le but de vérifier si l'état des protéines à l'interface air/eau se comporte comme prévu et que la technique de déposition permet un étalement adéquat, on doit tracer la courbe de pression de surface pour chaque protéine.

Les protéines sont dissoutes dans un tampon approprié puis étalées

sur une sous-phase permettant un minimum de changement dans la nature de la protéine. La méthode de Trurnit, comme il a déjà été mentionné, est utilisée pour l'étalement. On dépose environ 1 ml de protéine à concentration de 0.04 - 0.05 mg/l et avec un débit de 0.200 ml/min. La seringue est raccordée à un tube que l'on fixe au dessus de la tige de verre (voir schéma #7). Cette tige a une longueur de 7.0 cm, un diamètre de 0.3 cm et est fixée au fond du bain par une pièce de téflon. Une partie de la tige, soit 2.0 cm, sort au dessus du niveau de l'eau.

On passe ensuite à la compression du film dont les valeurs sont rapportées sur un graphique représentant la force appliquée en newton/cm (dyne/cm) en fonction de la surface occupée par les molécules en m^2/mg .

Les résultats obtenus avec un système de degrés sont très satisfaisants. Le seul inconvénient est que toutes les mesures sont retranscrites point par point. Dans le but de faciliter le travail et de permettre l'enregistrement automatique des courbes de pression de surface, nous avons utilisé le principe du transducteur magnétique linéaire.

Méthode du transducteur magnétique linéaire

Cet appareil fut conçu par Trurnit, H.J. et coll. (1959). En 1960, Mann, J.A. et coll. utilisèrent le même principe et y apportèrent quelques modifications qu'ils complétèrent en 1963. Après la mise au point du principe, les différents groupes de chercheurs travaillant en monocouche amenèrent leurs propres transformations. (Gaines, G.L., Jr., (1963), Poulsen, B.J., & Lemberger, A.P. (1965), Frommer, M.A., & Miller, I.R. (1965), Suzuki, A., & coll. (1967), Joos, P. (1968) et finalement Fromherz, P. (1975)). Chacun

d'eux travaillèrent dans le but d'étudier plus profondément et avec plus de rapidité expérimentale les substances organiques d'intérêt biologique incluant les protéines et les polypeptides.

L'appareil utilisé est le même que celui avec les degrés. La seule différence est dans la méthode de détection de la force appliquée et son agencement au système.

Caractéristiques

Un bain principal voir p. 59 .

Un bain thermostaté voir p. 61

Une barrière mobile voir p. 61

Un fil de torsion

En utilisant un transducteur magnétique linéaire, il faut se servir d'un fil de torsion qui permette de travailler dans les limites de déplacement linéaire soit ± 1.27 cm. Différents diamètres peuvent donc être choisis selon les limites de pression dans lesquelles on veut caractériser une substance.

Un balancier

Comme dans le système précédent, il est rattaché de la même façon au fil de torsion. La seule différence est que le bras de levier à l'extrémité duquel se trouve le crochet de calibration est rallongé dans l'autre sens afin de pouvoir rattacher à ce dernier la partie métallique qui se déplace dans le centre de la bobine du transducteur (voir schéma #8).

Un flotteur

Il est identique à celui du montage sur le principe de degrés (page 63)

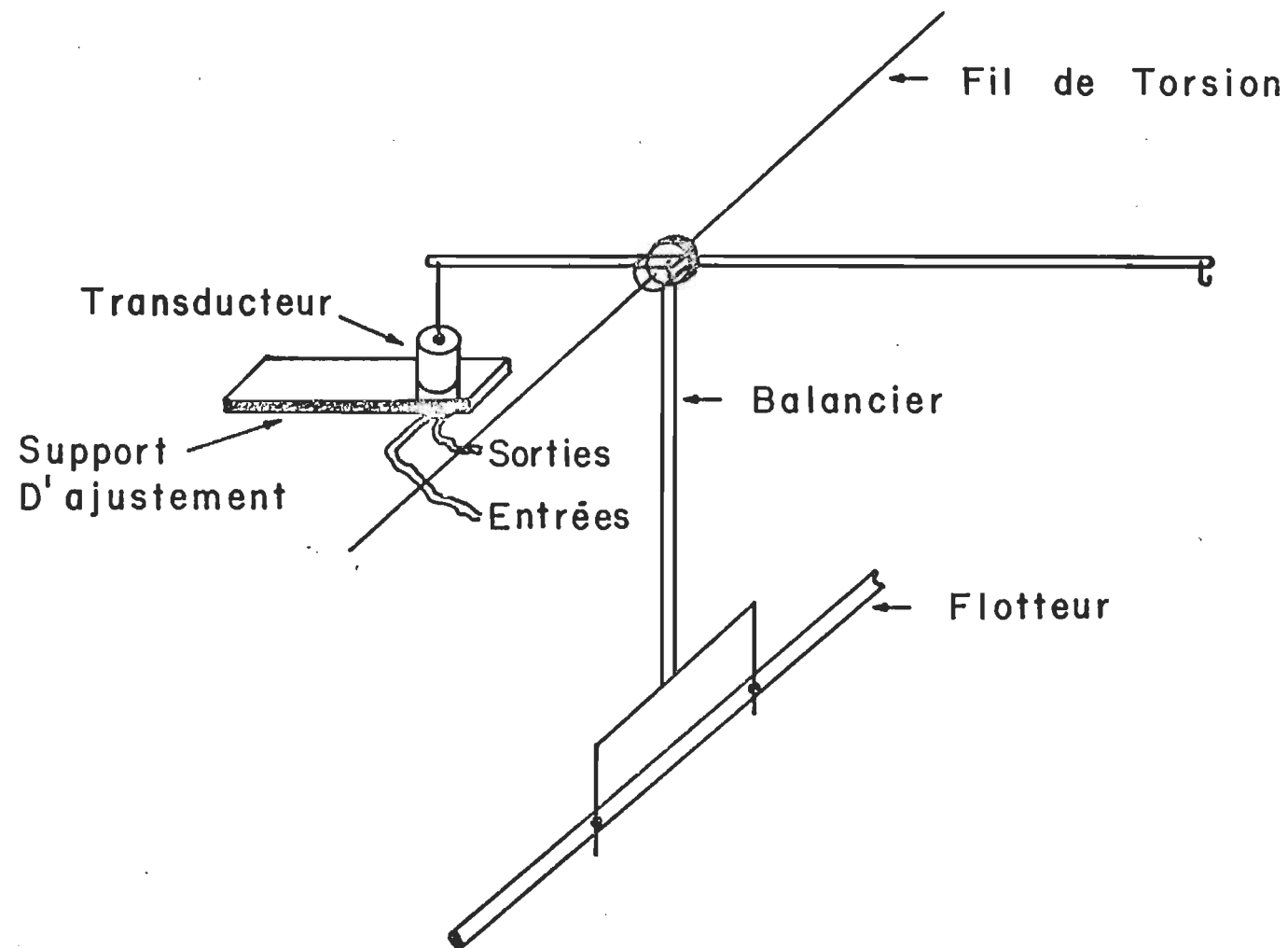


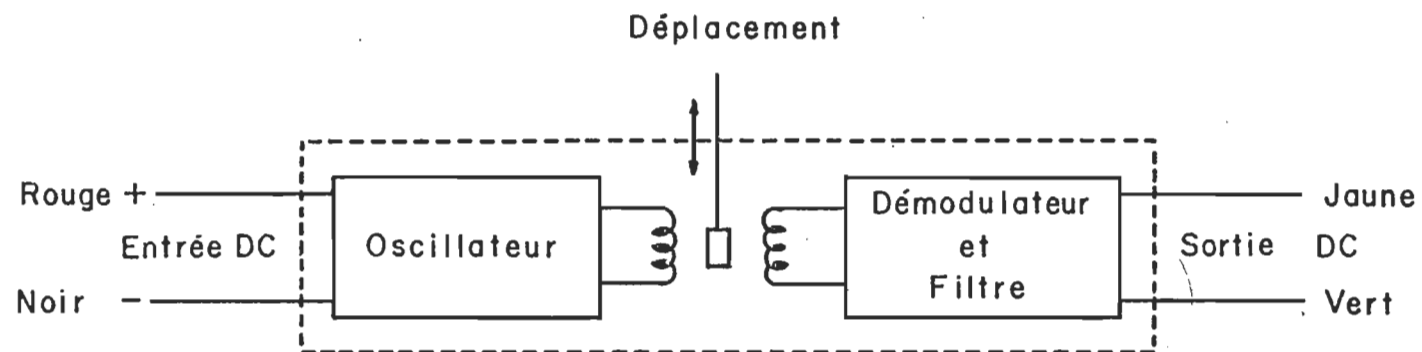
Schéma 8. Utilisation du transducteur magnétique linéaire afin de déterminer la force appliquée sur le flotteur par la monocouche.

Un transducteur magnétique linéaire

Situé à l'extrémité opposée du bras de levier (schéma #8), on l'ajuste au départ pour obtenir notre zéro puis il reste fixe. Le principe de fonctionnement est très simple. Il s'agit du déplacement d'une partie centrale métallique à l'intérieur d'une bobine. Ce déplacement produit un changement de phase entre deux signaux. Le signal résultant est amplifié puis est visualisé soit sur un multimètre numérique ou sur un enregistreur. Le transducteur utilisé est du type 24 DCDT ce qui signifie qu'il fonctionne sur 24 volts en courant continu. Cependant, il peut aussi être alimenté en continu par un voltage inférieur. Alors la seule différence sera dans le signal qui sera moins intense puisqu'il est proportionnel à la puissance d'entrée si on est à l'intérieur du déplacement maximum. Quelques caractéristiques générales du transducteur magnétique linéaire sont présentées au schéma #9 (p. 77).

En ce qui concerne le principe, l'étalonnage, la standardisation et les courbes de pression de surface, le cheminement à suivre est identique à celui du système de degrés (voir page 64).

Il y a peut être une petite différence dans le tracé des courbes de pression de surface. Dans le cas présent, il faut faire un réajustement pour l'aire occupée par molécule car le transducteur ne revient pas au zéro. Donc le flotteur en se déplaçant, dû à la pression exercée par le film, entraîne un faible déplacement du zéro pour le calcul de la surface. Cette différence augmente si l'on diminue le diamètre du fil de torsion car dans ce cas, pour une même force, le déplacement du flotteur sera plus grand. Cette différence peut être faite électroniquement ce qui facilite le travail du calcul de la surface.



Model : 24 DCDT - 500
 Voltage d'entrée : 24 volts DC
 Déplacement : ± 1.27 cm
 Lecture maximum : 26.0 volts
 Linéarité : ± 0.5 % pleine échelle.

Schéma 9. Transducteur magnétique linéaire.

Il a donc été question dans cette dernière partie des systèmes à forte pression de surface. Ceux-ci ont pour but premier de vérifier l'ensemble du montage et la qualité de l'eau puis en second lieu, d'examiner les hypothèses relatives à la configuration des protéines à l'interface air/eau. Ce cheminement permet de vérifier l'état des préparations de nos protéines.

Cependant avec un tel système on ne peut prendre des pressions de surface inférieures à 0.05×10^{-5} newton/cm (dyne/cm) et ce, dans les meilleures conditions. Donc, il est impossible d'utiliser ce principe pour déterminer des poids moléculaires avec précision ou des énergies d'interaction moléculaire. Dans ces cas, nous devons travailler à des forces inférieures à 0.05×10^{-5} newton/cm (dyne/cm). Dans certaines conditions, les forces allant jusqu'à 0.10×10^{-5} newton/cm (dyne/cm) peuvent être acceptées mais dans la majorité des cas la relation utilisée n'est plus linéaire. Il nous fallait donc construire un nouveau système nous permettant de travailler à de très faibles pression de surface. Il faut rajouter que les principes déjà mis au point par Guastalla, J. (1938), basés sur l'angle de contact d'une lamelle plongeant dans l'eau, et celui de Gershfeld, N.L., Pagano, R.E., Friauff, W.S. et Fuhrer, J. (1970), appliquant la méthode d'une tige centrale se déplaçant face à deux photodiodes, ne semblaient pas répondre dans l'ordre de grandeur indiqué selon les résultats qu'ils ont obtenus.

Nous avons donc conçu notre propre système nous permettant d'obtenir des forces dans l'ordre du millidyne. Il sera donc question dans les pages suivantes de ce nouveau principe et de ses applications pouvant être faites dans l'étude des constituants de la membrane interne du chloroplaste.

Système à faible pression de surface

Dans le but d'obtenir une plus grande surface de déposition, nécessaire pour les protéines, nous avons utilisé un bain de Langmuir de plus grandes dimensions.

Caractéristiques

Un bain en aluminium

longueur	(cm)	61.9
largeur	(cm)	13.2
hauteur	(cm)	1.5

Les côtés ont une épaisseur de 0.50 cm. Afin d'éviter le contact de l'eau avec l'aluminium, produisant un oxyde d'aluminium "nocif" pour le travail en monocouche, on recouvre la surface interne du bain avec du téflon de 0.08 cm d'épaisseur et adhésif sur une surface. Dès que l'on constate des problèmes de nettoyage de la surface lisse du téflon, on change tout simplement le recouvrement, d'ailleurs nous en avons déjà fait mention pour le bain en verre (voir p.59).

Une barrière mobile

longueur	(cm)	19.0
largeur	(cm)	1.2
hauteur	(cm)	0.3

Cette dernière est complètement recouverte de téflon. Elle est actionnée par un moteur, à vitesse variable (0-400 RPM) et réversible, qui est relié à une visse sans fin de 24 filets pour 2.54 cm de longueur.

Un fil de torsion

Dans le cas présent, le diamètre du fil de torsion est beaucoup plus important que pour un système à forte pression de surface. Les raisons en sont très simples. Puisque l'on travaille dans l'ordre du millidyne, il est aisé de comprendre qu'une simple variation de quelques centièmes de mm ou un changement de tension du fil entraîne une grande différence dans la sensibilité. On choisit donc un fil de bonne résistance à la tension (tungstène) et un diamètre suivant la sensibilité désirée. Cependant, on ne peut prendre un fil de diamètre inférieur à 0.033 cm car la fluctuation des mesures à faible pression devient trop grande.

Un balancier

Les caractéristiques principales du balancier se résument ainsi, non statique, non oxydable et très léger. Son diamètre est de 0.02 mm et dans le cas de la longueur du bras de levier à la distance flotteur-fil de torsion, ils sont respectivement de 4.6 cm et de 6.7 cm. La tige (d) fixée au flotteur, se continue verticalement, au dessus du fil de torsion, dans la partie centrale du système de détection (voir schéma #10 p. 81).

Un flotteur

longueur	(cm)	11.2
largeur	(cm)	0.6
hauteur	(cm)	0.002

Il est complètement en mica et il est rattaché aux parois du bain par deux feuilles d'or.

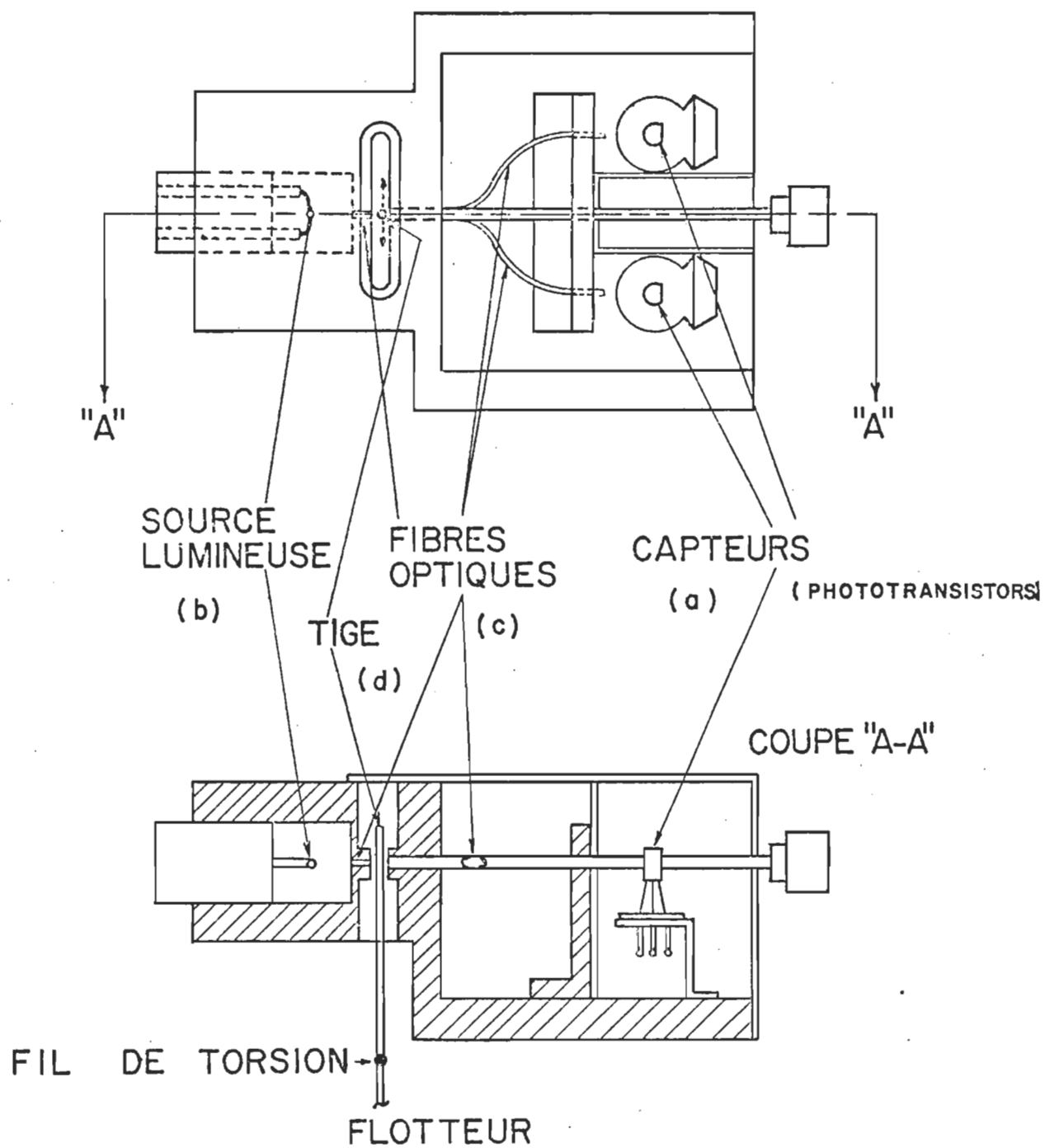


Schéma 10. Plan du montage mécanique du système à faible pression de surface.

Un système de détection

Puisque c'est dans cette partie que l'on retrouve toute l'importance du montage nous élaborerons donc, en détail, l'étape suivante, soit le principe de fonctionnement. Quant à la technique des monocouches, elle est identique à celle expliquée à la page 64, sauf une modification. Le changement consiste dans la longueur de la tige de déposition qui est de 3.5 cm (la profondeur du bain étant de 1.5 cm) au lieu de 5.0 cm que l'on utilise pour le système à forte pression de surface.

Utilisation de fibres optiques

Principe de fonctionnement

Le système de détection (partie (a) des schémas #10 et #11) est contenu à l'intérieur du bloc d'aluminium anodisé placé au dessus du fil de torsion. Les caractéristiques de ce dernier sont clairement illustrées sur le schéma #10 représentant le plan du montage mécanique. Cette partie contient le système de mesure qui est composé principalement d'une lampe à incandescence (b), de trois fibres optiques (c) et de deux phototransistors à gain élevé (a).

La lumière de la lampe (b) est acheminée au capteur central (d) par une fibre optique (c). La tige centrale (d) est de diamètre égal à l'une des fibres optiques conduisant aux phototransistors d'Arlington et est rattachée au fil de torsion par du ciment; ce fil de torsion est relié au flotteur. La tige est placée entre la fibre optique amenant la lumière de la lampe et les deux fibres acheminant la lumière aux phototransistors. Ces deux fibres sont collées ensemble et dans l'axe perpendiculaire au capteur.

La tension générée aux émetteurs des phototransistors est proportionnelle au nombre de quanta captés par chacun de ceux-ci. Pour équilibrer cette tension, on utilise un potentiomètre (partie (e) du schéma #11) dans le circuit d'émetteur d'un des transistors. Ce réglage doit s'effectuer lorsque la tige est en position centrale, ainsi la tension résultante est nulle à la sortie de l'amplificateur différentiel (f). On applique ensuite ces deux signaux à un amplificateur différentiel à gain variable (g) dont la sortie est raccordée à un voltmètre numérique.

Les effets dus aux instabilités de tension de ligne sont minimisés à l'aide de régulateurs de tension alimentant la lampe (b), les phototransistors (a) et l'amplificateur opérationnel (f). Ce dernier est alimenté par une tension stabilisée à 15 volts (i). Dans le cas de la lampe et des phototransistors, c'est une source de 10 volts (h) qui les alimente.

Un filtre passe-bas est incorporé au circuit dans le but d'éliminer le bruit et les parasites pouvant perturber l'enregistrement du signal (voir schéma #12). Les détails du montage électronique nous sont donnés sur le schéma de la page précédente.

Etalonnage

La sensibilité du système doit être déterminée et pour ce faire nous utilisons des poids calibrés avec l'électrobalance Cahn modèle gram. On conserve ces poids dans un dessiccateur sous vide.

Chacun des poids variant de 0.04110 - 9.73500 mg est appliqué délicatement avec une pince antistatique sur le plateau de calibration et retiré par un aimant. La force appliquée par le poids entraîne une légère déviation de la tige centrale ce qui a pour effet de dégager légèrement



Schéma 12. Filtre passe-bas.

une fibre optique entraînant une augmentation de lumière arrivant sur celle-ci ce qui se traduit par une variation de la tension générée aux bornes des deux phototransistors. Le fait que la tige soit de diamètre égal à l'une des fibres conduisant la lumière aux photocellules est d'une importance très grande pour avoir un déplacement linéaire. Le diagramme suivant nous montre ce qui se produit :

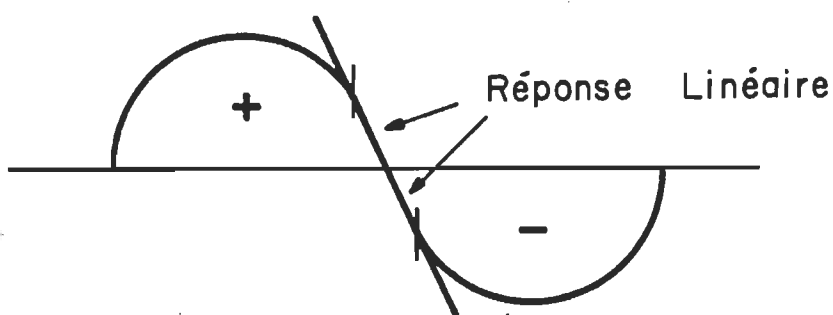


Schéma 13. Représentation du signal.

Une partie du signal est positive, l'autre négative donc une fibre réceptrice positive, l'autre négative. Il y a seulement une petite région dans laquelle on peut travailler puisque c'est là seulement que le signal est linéaire. Si le diamètre de la tige est trop grand ou trop petit, la partie de la fibre découverte ne sera pas égale à la partie cachée de l'autre fibre et par le fait même le signal à la sortie ne pourra pas être linéaire.

Après avoir effectué une série de mesures, on porte graphiquement la valeur des poids en fonction du voltage puis on détermine la sensibilité qui est la pente de la droite multipliée par les mêmes facteurs

que nous avons déjà mentionnés, soit:

$$S = \left(\frac{P}{V}\right) \times \frac{g \times l_c}{l_f \times L}$$

S: sensibilité

P: poids

V: voltage

g: facteur de correction = 980×10^{-5} newton/g
(dyne/g)

l_c : bras horizontal

l_f : bras vertical

L: longueur efficace du flotteur

La sensibilité dans un tel système est obtenue en newton/cm volt (dyne/cm volt). Le fait d'obtenir une relation linéaire lors de la calibration ne signifie pas que l'ensemble du bain, comprenant la qualité de l'eau, le système de détection et autres particularités, répondent d'une façon parfaite. La seule technique que nous ayons à notre disposition pour vérifier le bon fonctionnement du montage est la détermination du poids moléculaire de protéines. Ainsi il serait possible de vérifier expérimentalement avec quelques protéines l'efficacité du système que nous avons mis au point.

Standardisation

Guastalla, J. (1939b) suggéra que, si l'équation cinétique

$$FA = KT$$

F: force appliquée

A: aire occupée par molécule

K: constante de Boltzmann: 1.3805×10^{-23}
joule mol/deg ($\times 10^{-16}$ erg mol/deg)

T: température absolue

pour les films gazeux pouvait être appliquée aux monocouches de protéines à forte dilution, le poids moléculaire pouvait être déterminé par

la mesure de pression de surface. C'est Bull, H.B. qui en 1945a,b,c et les années suivantes appliqua la théorie de l'état gazeux des protéines et détermina le poids moléculaire d'une façon satisfaisante. Bull utilisa la relation suivante:

$$FA = nRT + nS_p F$$

F: pression de surface
 A: surface totale occupée par la monocouche
 n: nombre de moles de protéines étalées
 R: constante des gaz parfaits
 S_p : l'aire occupée par une mole de protéine
 T: la température absolue

Nous pouvons donc voir s'il y a relation linéaire en traçant le graphique de FA en fonction de F. La droite obtenue extrapolée à $F \rightarrow 0$ nous donne la valeur limite de FA sur l'axe des ordonnées et à ce moment $nS_p F$ devient égal à zéro. L'équation devient alors:

$$FA = nRT \quad \text{puisque } n = \frac{P}{M}$$

P: poids de substance déposée
 M: poids moléculaire de la substance

alors nous obtenons:

$$M = \frac{PRT}{FA}$$

De cette relation, nous déterminons donc le poids moléculaire de la protéine à l'interface air/eau.

Cette standardisation par la détermination du poids moléculaire est fonction, non pas seulement du système de mesure, mais de l'état des protéines à l'interface air/eau. Il faut donc, comme nous l'avons mentionné dans les principes de la technique des monocouches, à la page 64, connaître certaines propriétés des protéines que l'on dépose. Dans le cas contraire, nous devons modifier la technique expérimentale pour en arriver

à des conclusions satisfaisantes qui sont directement liées à la surface occupée en m^2/mg de protéine à une pression donnée.

Les différents montages qui ont été décrits nous ont permis d'obtenir des résultats intéressants. C'est d'ailleurs dans la partie qui va suivre qu'ils sont exposés.

RESULTATS

RESULTATS

La première étape nous donnera les résultats obtenus dans la préparation des protéines puis nous passerons à l'étude de l'état monomoléculaire de ces protéines.

Dans un premier temps, il est primordial de travailler à forte pression de surface afin de tracer les courbes de pression de surface de l'albumine de bovin, de la G actine (muscle de lapin), du cytochrome c (coeur de cheval), de l'ovalbumine et finalement de la rhodopsine de bovin.

La dernière partie de ce chapitre sera consacrée à la détermination du poids moléculaire des protéines à faible pression de surface et ce, avec notre propre système monté avec des fibres optiques.

Préparation des protéines

Albumine de bovin

Si l'on regarde le schéma #4 p. 22 représentant l'albumine de bovin sur gel de polyacrylamide, après électrophorèse, on constate sa très grande pureté. Il est donc inutile de purifier davantage car les méthodes employées ne pourraient pas augmenter la qualité de la protéine.

On pèse donc l'échantillon puis on prend la densité optique à 280 nm. Le coefficient d'absorbance $E_1^{1\% \text{ cm}}$ (loi de Beer) est 6.8 ou 6.6 selon qu'on prenne la valeur de Van Kley, H.J. et Stahmann, M.A. (1956) ou de Wetlaufer, D.B. (1962). Nous avons utilisé la valeur de 6.6 puisque nous avons travaillé dans les conditions expérimentales semblables à celles de Wetlaufer,

D.B. (1962), soient pH de 5.2 et tampon phosphate 10^{-3} M. Il est important que la protéine soit très pure pour qu'il n'y ait pas d'interférence i.e., absorbance due à d'autres protéines.

Nous calculons la concentration en considérant que pour une absorbance de 6.6 à 280 nm nous avons une concentration de 10.0 mg/ml à 25°C. On utilise aussi soit la méthode de Biuret quand la concentration est élevée ou celle de Follin-Lowrey à faible concentration.

Lors des essais, en monocouche, les échantillons sont conservés dans la glace et sont agités le moins possible afin d'éviter la dénaturation. Cette préparation peut maintenant servir pour la déposition et étalement à l'interface air/eau selon la méthode de Trurnit, H.J. (1960).

Pour vérifier si notre protéine en solution est encore native, on utilise la dispersion optique rotatoire (D.O.R.). Dans ce cas, on mesure le pourcentage d'alpha-hélicité de la protéine. Il faut aussi que cette dernière ait au moins 20% d'alpha-hélicité pour obtenir de bons résultats. Pour l'albumine de bovin, le pourcentage d'alpha-hélicité est de 45 - 60% selon Van Holde, K.E. (1971) et 45.0% selon Tanford, C. (1961).

On calcule le pourcentage d'alpha-hélicité de la valeur maximum de l'angle de rotation à 233 nm (effet Cotton). Le graphique #1 représente les résultats obtenus pour une concentration de 0.5 mg/ml à pH: 5.7 dans un tampon phosphate 0.1M et KCl 1M. Des résultats similaires sont obtenus en solubilisant la protéine dans l'eau.

Pour les calculs d'alpha-hélicité à l'aide de la mesure de l'effet Cotton, on se sert des équations suivantes:

- angle de rotation observé à une longueur d'onde:

$$\alpha_{\lambda} = S \cdot \theta$$

α_{λ} : angle de déviation à la longueur d'onde lambda (degré)

- pouvoir rotatoire à une longueur d'onde:

$$[\alpha]_{\lambda} = \frac{100}{\ell \cdot c} \alpha_{\lambda}$$

$[\alpha]_{\lambda}$: pouvoir rotatoire observé à la longueur d'onde lambda (deg ml/dm g)

ℓ : parcours optique (dm)

c : concentration (g/100 ml)

Le pouvoir rotatoire est le même pour une substance donnée, quelles que soient la concentration, la sensibilité et la cellule utilisées, à une même longueur d'onde.

- rotation molaire à une longueur d'onde:

$$[m]_{\lambda} = \frac{MRW}{100} [\alpha]_{\lambda}$$

$[m]_{\lambda}$: rotation du résidu moyen

MRW: poids du résidu moyen (115 daltons pour les protéines)

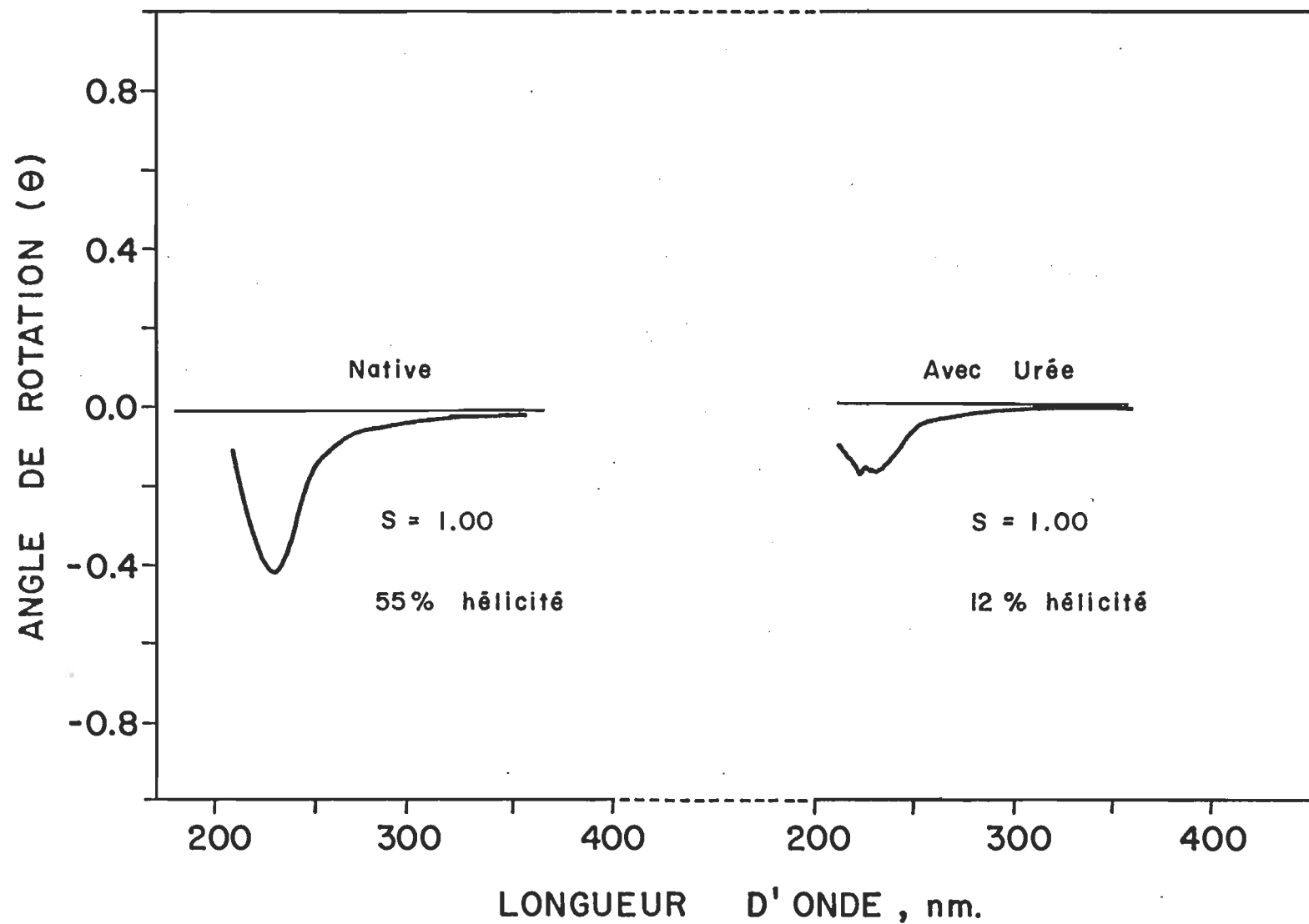
En faisant intervenir un terme correctif pour l'indice de réfraction, nous obtenons la rotation réduite du résidu moyen à une longueur d'onde:

$$[m']_{\lambda} = \frac{3}{(n^2 - 2)} \frac{MRW}{100} [\alpha]_{\lambda}$$

$\frac{3}{(n^2 - 2)}$: 0.782 pour l'effet Cotton à 233 nm

n : indice de réfraction

A l'aide de ces équations, on peut calculer le pourcentage d'alpha-hélicité comme suit:



Graphique 1. Dispersion optique rotatoire de l'albumine de bovin avec et sans urée pour la détermination du pourcentage d'alpha-hélicité.

$$\% \text{ d'alpha-hélicité} = \frac{[\text{m}]_{\lambda} - [\text{m}]_{\lambda}^{0\%}}{[\text{m}]_{\lambda}^{100\%} - [\text{m}]_{\lambda}^{0\%}} \times 100$$

$[\text{m}]_{\lambda}^{0\%}$: valeur de $[\text{m}]_{\lambda}$ pour 0% d'alpha-hélicité (-2000 degrés cm²/décimole)

$[\text{m}]_{\lambda}^{100\%}$: valeur $[\text{m}]_{\lambda}$ pour 100% d'alpha-hélicité (-12000 degrés cm²/décimole)

(Van Holde, K.E. (1971))

Nous avons obtenu une valeur de 55% d'alpha-hélicité ce qui correspondrait à la valeur déterminée par Van Holde, K.E. (1971) et Tanford, C. (1961).

Dans cette partie, nous avons confirmé que notre protéine en solution conserve sa structure secondaire. Pour être encore plus certain, nous avons ajouté de l'urée, à concentration totale 6M, ce qui a eu pour effet de nous donner une valeur de 12% d'alpha-hélicité (voir graphique #1 p. 94).

Donc notre protéine n'est pas dénaturée en solution et nous l'utilisons en monocouche sous cette forme.

Calcul du pourcentage d'alpha-hélicité pour l'albumine de bovin:

Conditions expérimentales sans urée:

KCl: 1M

tampon phosphate: 0.1M

pH: 5.7

température: 23°C

parcours optique: 1.0 cm

sensibilité: 1.00

concentration: 0.5 mg/ml

angle mesuré: -0.420 degré

- Pouvoir rotatoire spécifique:

$$[\alpha]_{\lambda} = \frac{100}{\ell \cdot c} \alpha_{\lambda}$$

$$[\alpha]_{233} = \frac{100 \times (-0.420) \text{ degré} \times 100 \text{ ml}}{0.1 \text{ dm} \times 0.05 \text{ g}} = -8.4 \times 10^{-5} \text{ deg ml/dm g}$$

- Rotation molaire réduite du résidu moyen:

$$[m']_{\lambda} = \frac{3}{(n^2 - 2)} \frac{\text{MRW}}{100} [\alpha]_{\lambda}$$

$$[m']_{233} = 0.782 \times \frac{115 \text{ g/mole}}{100} \times (-8.4 \times 10^{-5}) \text{ deg ml/dm g} =$$

$$-9660 \text{ deg cm}^2/\text{décimole}$$

- Pourcentage d'alpha-hélicité:

$$\% \text{ d'alpha-hélicité} = \frac{[m']_{\lambda} - [m']_{\lambda}^{0\%}}{[m']_{\lambda}^{100\%} - [m']_{\lambda}^{0\%}} \times 100$$

$$\% \text{ d'alpha-hélicité} = \frac{(-7554) - (-2000)}{(-12000) - (-2000)} \times 100 = 55\%$$

Conditions expérimentales avec urée:

Même chose que sans urée sauf concentration de 6M en urée dans le tampon.

angle mesuré: -0.180 degré

% d'alpha hélicité = 12%

G-actine (muscle de lapin)

On prépare la G actine à partir de la poudre acétonique (Rees, M.K. et coll.(1967)) ou directement des myofibrilles. Par contre, cette dernière préparation est deux fois plus longue et les résultats n'étant pas meilleurs, on utilise donc la première méthode.

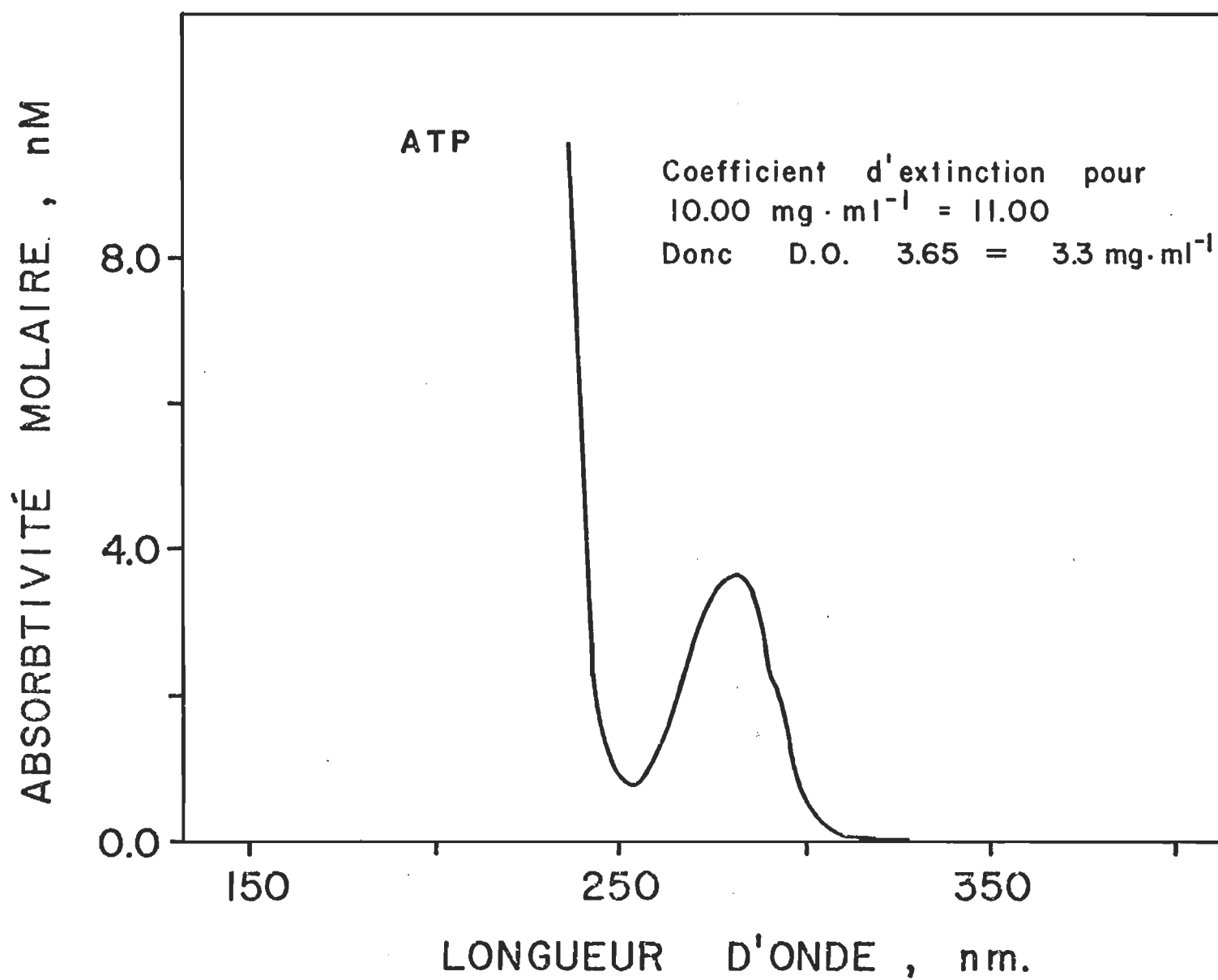
Après avoir obtenu la F actine purifiée à une concentration de 10 à 15 mg/ml, il suffit de la dépolymériser et de passer ensuite le tout sur une colonne Sephadex G-200.

Pour la dépolymérisation, nous avons utilisé un petit montage très simple. Il est composé d'un tube de plexiglass de 25 cm de long et de 6 cm de diamètre. On fixe à l'intérieur du tube le sac à dialyse contenant la F actine et une bille d'acier inoxydable agissant comme facteur mécanique pour briser les liaisons actin-actin. Le sac est fixé à deux bouchons de caoutchouc à chaque extrémité du tube. Puis on fixe ce dernier à une plaque de plexiglass placée verticalement que l'on fait tourner à environ 5 révolutions par minute. Le tube est rempli de tampons à dialyse que l'on change après 8.0 heures. On laisse dépolymériser pendant 24 heures.

L'étape suivante consiste à passer le contenu du sac à dialyse sur colonne G-200. La concentration obtenue après purification est de 3.3 mg/ml (voir graphique #2). On vérifie le degré de pureté par électrophorèse et comme le montre le schéma #4, p. 22, on obtient une très bonne pureté, donc cette préparation est directement utilisable en monocouche sauf que nous devons la diluer.

On peut conserver la G actine plus longtemps en la polymérisant dans du KCl 3M. On centrifuge ensuite 20 min. à 40,000 g et l'on garde le tube tel quel à 5°C. Pour obtenir la G actine, on reprend la procédure de dépolymérisation. Une autre méthode qui vient d'être mise au point par Grandmont, L.A. et Gruda, J. (1977) en utilisant la phalloïdine comme stabilisateur permet de conserver la G actine diluée au moins 2 semaines.

On constate que la G actine diluée et sans préservatif ne se conserve pas très longtemps. Ce n'est pas très pratique surtout dû à la préparation qui est très longue. Heureusement, une nouvelle méthode mise au



Graphique 2. Concentration de la G actine suite à sa purification sur une colonne de Sephadex G-200.

point par Nonomura, Y., Katayama, E. et Ebashi, S. (1975) permet une préparation en deux heures et avec une très bonne pureté. Il faut cependant dialyser pendant 2 - 3 jours comme dans les autres cas (Spudich, J.A. et Watt, S. (1971)), mais il n'est pas nécessaire de passer sur colonne séphadex, donc très avantageux.

La G actine est diluée dans le solvant suivant:

KCl 0.1 M

ATP 0.5 mM

MgCl₂ 1 mM

Tampon phosphate 25 mM à pH 7.0

On dépose ensuite 1 ml de cette solution à concentration de 0.04 mg/ml.

La méthode spectrofluorimétrique est une technique rapide qui permet de vérifier si la G actine est native, à condition toutefois que la pureté de la protéine soit très bonne.

L'excitation est faite à 294 nm et l'émission à 325 nm lorsque la protéine est native. Ce pic est assigné au tryptophane qui, en solution, émet à 350 nm. Dans les protéines, dû à la stabilisation par les liaisons hydrophobes, il y a moins de perte d'énergie non radiative, donc déplacement du pic d'émission vers l'excitation. Si l'on traite avec la pronase, donc dénaturation de la G actine, il y a un déphasage de 30 nm c'est-à-dire, que le pic se situe alors à 355 nm et dans ce cas on sait que notre protéine n'est plus utilisable.

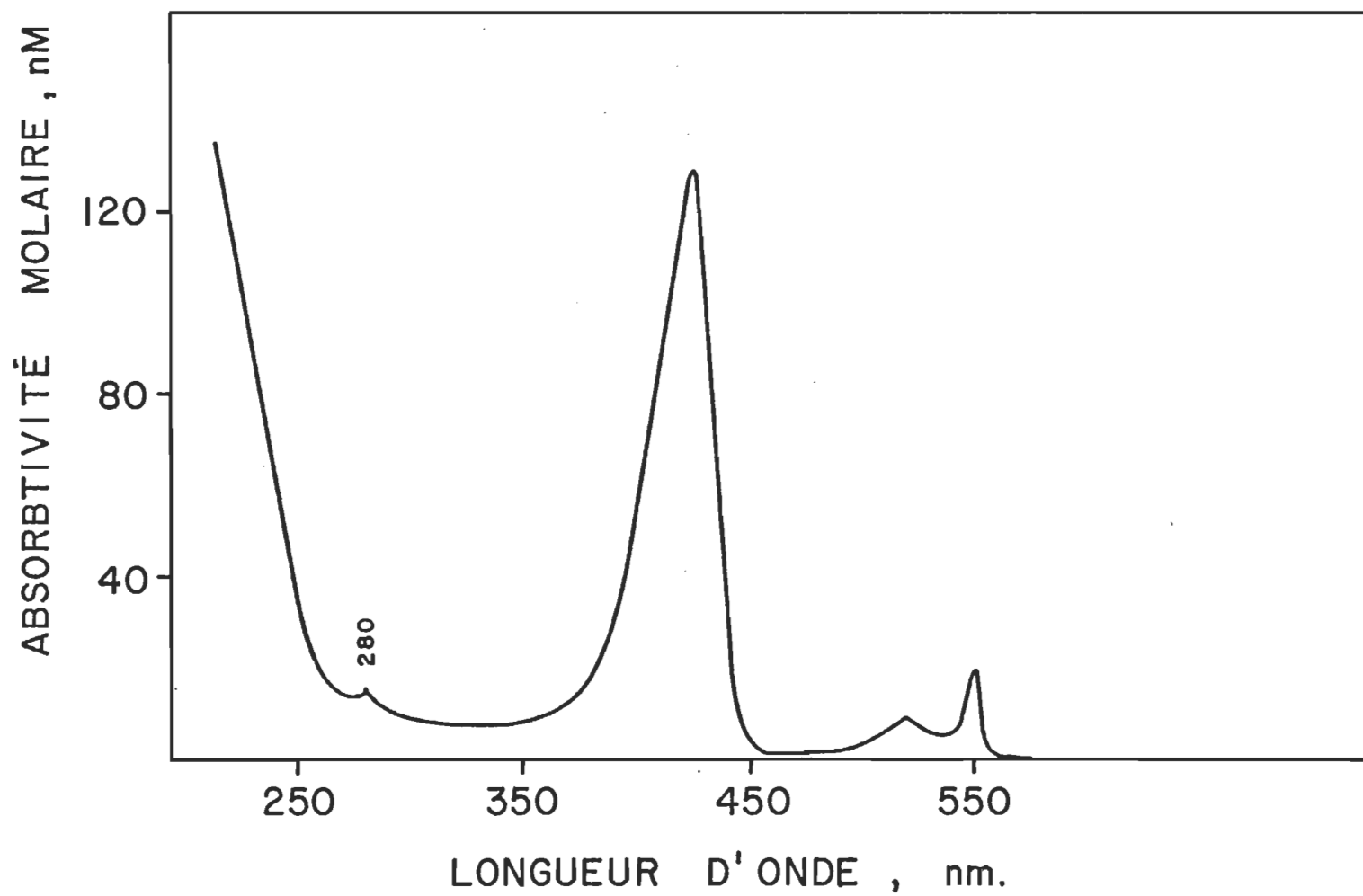
Cytochrome c (coeur de cheval)

Comme pour l'albumine, le cytochrome c est employé directement en monocouche. De la même façon aussi on détermine la concentration et on utilise un pH près du pH_i soit 10.05.

Cette protéine se dissout très bien dans le tampon glycine ou carbonate à pH 10.5 ou dans un tampon phosphate à pH 8.0. Un des points importants c'est qu'elle est très stable dans sa forme réduite même sous l'effet de la température (Margoliash, E. et coll. (1966)). On peut aussi varier le pH sans dénaturation puisque sa stabilité est très grande en milieu faiblement acide ou basique.

En plus de vérifier sa pureté par électrophorèse (voir schéma #4 p.22) on trace le spectre uv-visible. La bande apparaissant à 280 nm est significative du pourcentage d'impureté dû aux autres protéines (voir spectre sur graphique #3). On considère donc notre protéine comme pratiquement pure dû à la faible intensité du pic à 280 nm. Si la contamination est trop grande, on passe alors sur colonne Amberlite CG-50 (Na^+) et on élue avec du tampon phosphate 0.02 M à pH 7 et un gradient linéaire en sodium de 0.1 à 0.5 g/l (Dinon, H.B.F., & Thompson, C.M. (1968)).

On vérifie l'état natif par la dispersion optique rotatoire comme pour le S.A.B. Le cytochrome c contient 27% d'alpha-hélicité dans le cas oxydé et 34% dans le cas réduit.



Graphique 3. Spectre uv-visible du cytochrome c.

Ovalbumine

Une seule chose pourrait être rajoutée sur ce que l'on a déjà dit dans la partie précédente (voir p. 26) et c'est sur la vérification de son degré d'alpha-hélicité en solution. Dans l'eau, elle contient 31% d'alpha-hélice comparativement à 46% pour l'albumine et en solution dans le 2-chloroéthanol elle est à 25% hélicoïdale comparativement à 75% pour le sérum albumine bovine (Oncley, J.L. (1959)).

On dissout la protéine dans de l'eau à pH: 5.0 - 5.2 ou dans un tampon phosphate au même pH donc près de son point isoélectrique qui est de 4.6. On dépose ensuite la protéine à la surface de l'eau et on en étudie les propriétés dans ces conditions puisqu'elle est native comme l'a démontré le spectre de dispersion optique rotatoire.

Rhodopsine de bovin

La méthode de purification qui donna les meilleurs résultats selon Kossi, C.N. (1977) fut la purification au Triton X-100 des segments externes de bâtonnets (S.E.B.). Il utilisa différentes concentrations de Triton X-100 pour solubiliser les S.E.B. et il élua ensuite avec la même concentration de Triton X-100 en présence de tampon phosphate et du chlorure de sodium 0.1 M. Le tout passait sur une colonne de Célite et de phosphate tribasique de calcium. De très bons résultats furent obtenus sur colonne de cellulose Ectéola (voir tableau #4).

Le Triton X-100 a l'avantage d'être éliminé facilement avec le Bio-Beads SM-2. C'est en présence d'une concentration de 2%, en Triton X-100,

Tableau 4. Purification de la rhodopsine avec le Triton X-100.

Détergent	Solution de solubilisation des segments externes de bâtonnets (S.E.B.)	Colonne	Eluant	Rapport spectral $A_{278 \text{ nm}}/A_{498 \text{ nm}}$
Triton X-100	Triton X-100 2 ou 3%, tampon tris - HCl $2 \times 10^{-3} \text{M}$	Cellulose Ectéola	Triton X-100 2 ou 3%, tampon tris - HCl $2 \times 10^{-3} \text{M}$, NaCl 10^{-2}M	1.9 - 2.1
Triton X-100	Triton X-100 1 ou 2%, tampon phosphate de K $6.7 \times 10^{-3} \text{M}$	Célite + phosphate tribasique de calcium	Triton X-100 1 ou 2%, tampon phosphate de K 10^{-2}M , NaCl 10^{-2}M	2.3 - 2.5

que l'élimination fut la plus efficace, soit jusqu'à environ 0.05%. Cette concentration finale est déterminée par spectrophotométrie d'absorption uv-visible à λ_{max} de 275 nm. Dans le cas où l'élimination du Triton X-100 a été poussée trop loin i.e., concentration < 0.05%, des problèmes de solubilité de la rhodopsine dans l'éthanol 8 - 12% ou dans le n-hexane surviennent. Dans le diéthyléther les mêmes difficultés sont apparues et ce, à des concentrations de 10^{-6}M .

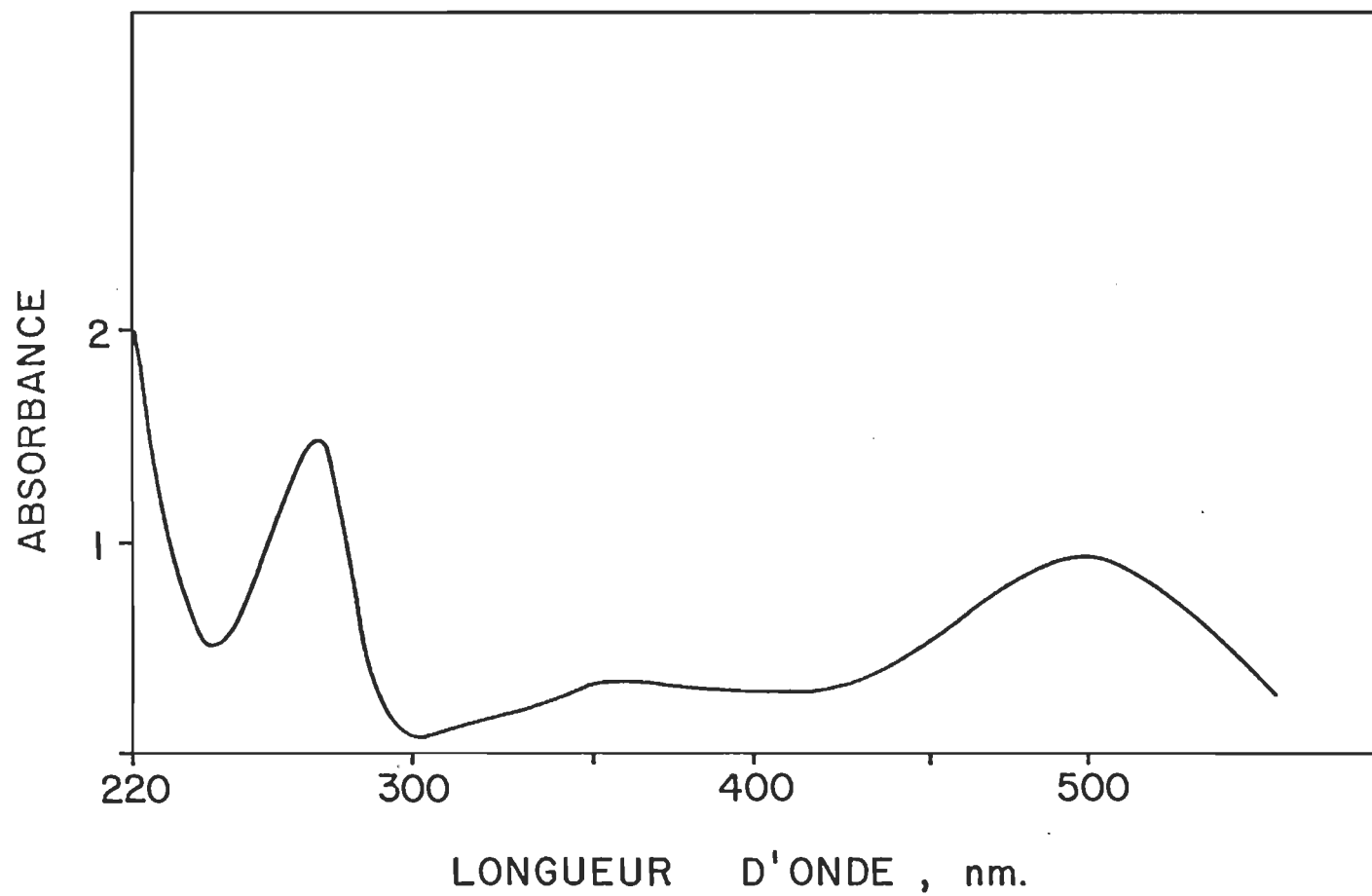
Nous avons donc utilisé la rhodopsine contenant 0.05% de Triton X-100 pour les études en monocouche.

Pour la rhodopsine, nous utilisons les rapports spectraux afin de déterminer son degré de pureté. Ces derniers sont basés sur le spectre d'absorption uv-visible qui présente trois pics:

- un pic à 278 nm, correspondant à l'absorption du tryptophane ou de la tyrosine de l'opsine;
- un pic à 350 nm correspondant à l'absorption du 11-cis-rétinal;
- un pic à 498 nm qui est dû à l'absorption de la rhodopsine.

On emploie les rapports entre les pics $A_{278 \text{ nm}}/A_{498 \text{ nm}}$, $A_{350 \text{ nm}}/A_{498 \text{ nm}}$. Un rapport spectral d'absorption à 278 nm et 498 nm faible (1.9 - 2.1) nous indique une très grande pureté de la rhodopsine (voir graphique #4, p. 22).

Comme on peut le constater, il est très facile de vérifier la pureté de cette protéine et, puisqu'elle est déjà en solution, on passe ensuite aux monocouches simplement en diluant selon les besoins. Auparavant, on détermine la concentration en rapportant la valeur de $\Delta A_{498 \text{ nm}}$ dans la relation de Lambert-Beer:



Graphique 4. Spectre d'absorption de la rhodopsine de bovin en solution dans de l'Ammonyx L0.

$$A = E C \ell$$

$$C = \frac{A}{E \ell}$$

A: absorbance

E: absorptivité molaire (l/mole cm)

C: concentration (mole/l)

ℓ : trajet optique (cm)

La valeur $E_{498 \text{ nm}}$ que nous avons retenue est celle obtenue par Wald, G. et coll. (1953) soit 40,600 l/mole cm.

Passons maintenant aux résultats obtenus en monocouche. Il est important de noter qu'il s'agit là d'un travail très minutieux et que les résultats obtenus en sont d'autant plus précis.

Système à forte pression de surface

Méthode des degrés

Étalonnage

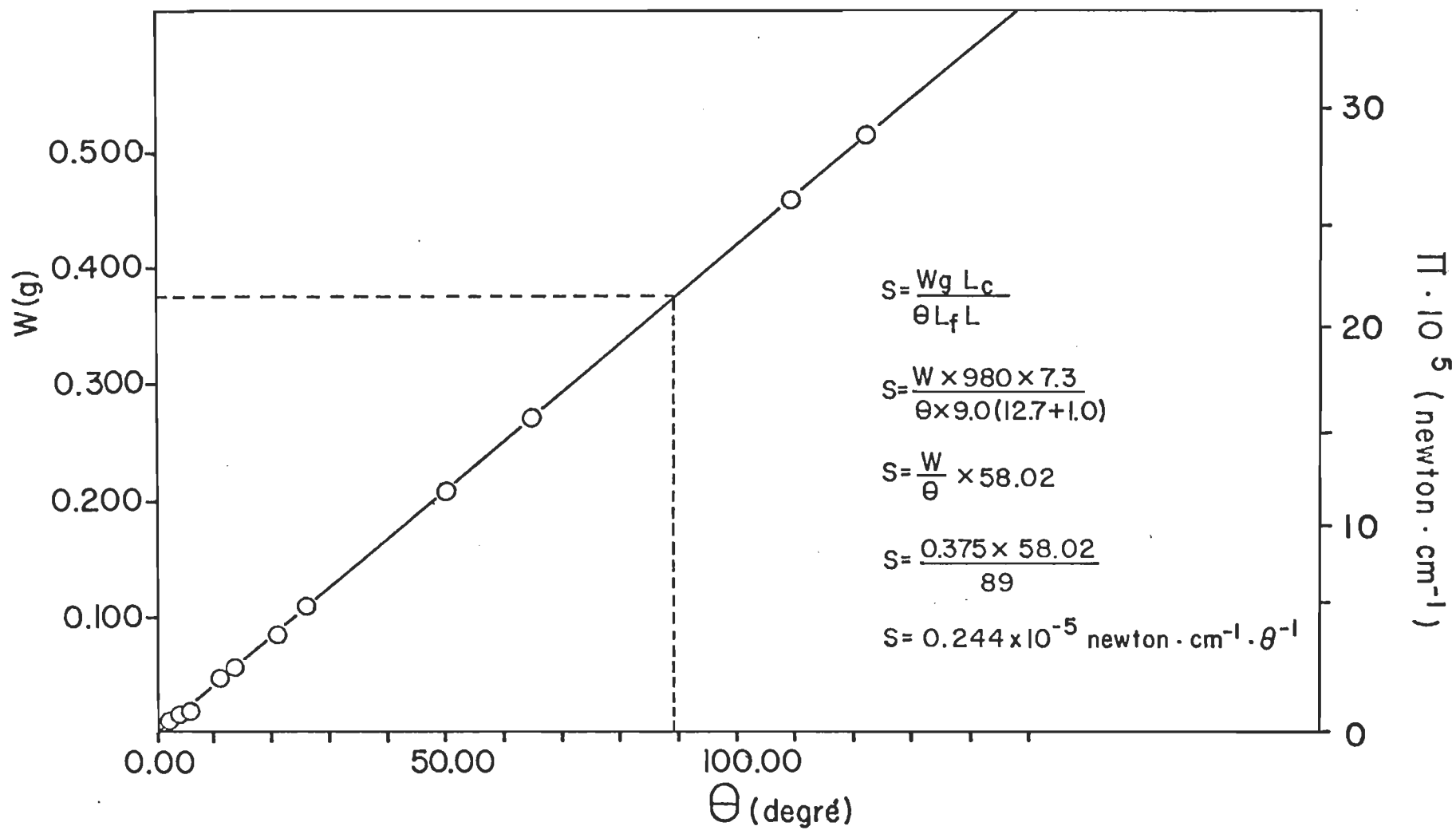
Par étalonnage, on entend ici la sensibilité du système. Après calibration avec différents poids on trace le graphique des poids en fonction du nombre de degrés de déviation tel que présenté sur le graphique #5 page suivante. Dans le cas présent, la pente (P/θ) obtenue est de 4.2×10^{-3} g/deg pour un fil de torsion de 0.023 cm de diamètre. La sensibilité est obtenue de la façon suivante:

$$S = \left(\frac{P}{\theta}\right) \times \frac{g}{I_f} \times \frac{1}{L} \quad (\text{voir p. 71})$$

$$S = 4.2 \times 10^{-3} \text{ g/deg} \times \frac{980 \times 10^{-5} \text{ newton/g} \times 7.3 \text{ cm}}{9.0 \text{ cm} \times (12.7 - 1.0) \text{ cm}}$$

$$S = 0.247 \times 10^{-5} \text{ newton/cm deg}$$

Différentes sensibilités sont obtenues selon le diamètre du fil de torsion et sa composition. Le tableau #5 nous donne une vue d'ensemble



Graphique 5. Calibration avec un fil de torsion de 0.023 cm de diamètre: système à forte pression de surface.

Tableau 5

Sensibilités obtenues avec le système des degrés selon différentes caractéristiques du fil de torsion.

Fil de torsion		Sensibilité (10^{-5} newton/cm deg)	Limite de mesure (10^{-5} newton/cm)
Composition	Diamètre		
Acier inoxydable	0.013	0.023	0.005 - 2.76 (instable)
	0.015	0.095	0.02 - 10.00
	0.020	0.170	0.08 - 20.00
	0.023	0.199	0.14 - 24.00
	0.023 (très tendu)	0.289	0.20 - 36.00
	0.033	0.415	0.80 - 50.00
Nickel-chrome	0.020	0.494	1.50 - 60.00
Nickel	0.023	0.244	0.12 - 30.00
	0.025	0.280	0.14 - 35.00
	0.028	0.300	0.16 - 40.00
	0.033	0.410	0.80 - 50.00
Molybdène	0.020	0.494	1.50 - 60.00
Fer-chrome (99% - 1%)	0.020	0.494	1.50 - 60.00
Tungstène	0.020	0.338*	0.50 - 40.00
		0.380*	0.50 - 40.00
		0.443*	1.50 - 60.00
		0.494*	1.50 - 60.00

Note: Pour chacun des fils une sensibilité différente est obtenue selon la tension appliquée à son étirement. De plus si le fil est de diamètre inférieur à 0.013 cm il est plus sujet à étirer donc il ne sera pas stable causant des variations dans la sensibilité. Nous ne devons pas dépasser 120 degrés afin d'éviter que le fil ne se torde et de ce fait ne puisse revenir au point de départ.

* La sensibilité pour le fil de tungstène dépend, plus que dans les autres cas, de la tension qu'on y applique.

des valeurs obtenues dans les mêmes conditions. Pour les courbes de standardisation et de pression de surface, nous avons utilisé la sensibilité telle que déterminée à la page 106. D'ailleurs voici les résultats que nous avons obtenus.

Standardisation

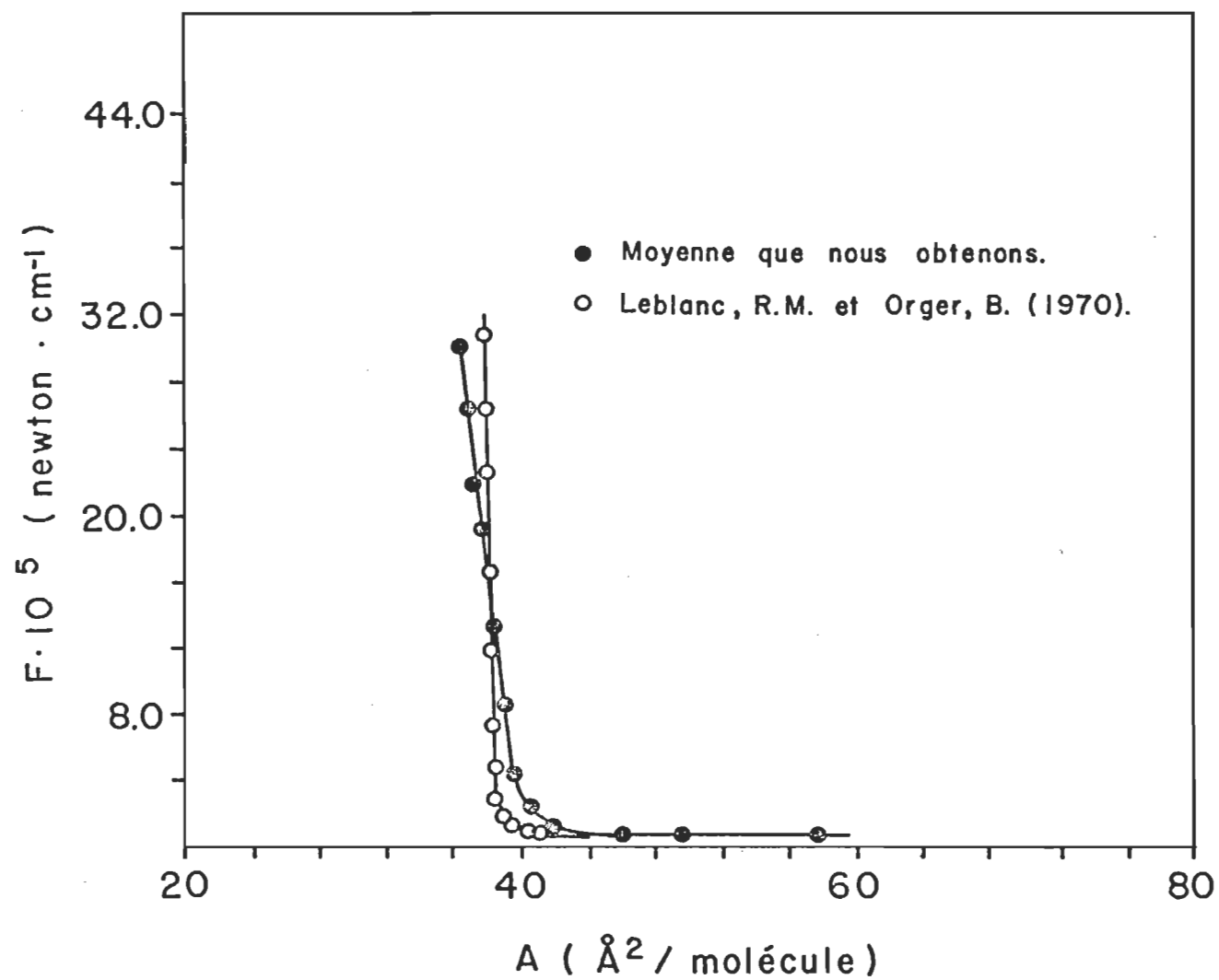
Cholestérol. Les courbes de pression de surface du cholestérol présentées sur le graphique #6, p. 110 furent tracées dans les conditions suivantes:

déposition: 0.10 ml
 solvant: diéthyléther
 sous-phase: HCl $10^{-2}M$
 concentration: $1.121 \times 10^{-3}M$
 température: $296.0^{\circ}K$
 H_2O : la plus pure (voir p. 36)
 vitesse de compression: uniforme et de 1.00 cm/min

Si l'on compare la courbe obtenue à celle de Leblanc, R.M. et coll. (1970), tracée sur le même graphique (cercles blancs), on constate qu'elles sont pratiquement identiques. Si l'on extrapole la portion de la courbe dite solide, à forte pression, sur l'axe des abscisses nous obtenons une valeur de 40.0 \AA^2 par molécule alors qu'une valeur de 38.7 \AA^2 était obtenue pour la courbe de référence.

Afin de mieux comprendre le principe de la standardisation, voyons maintenant ce que l'on obtient en se servant de molécules d'acide gras.

Acide arachidique et stéarique. Les conditions expérimentales sont les mêmes que pour le cholestérol sauf pour les sous-phases. Dans le cas



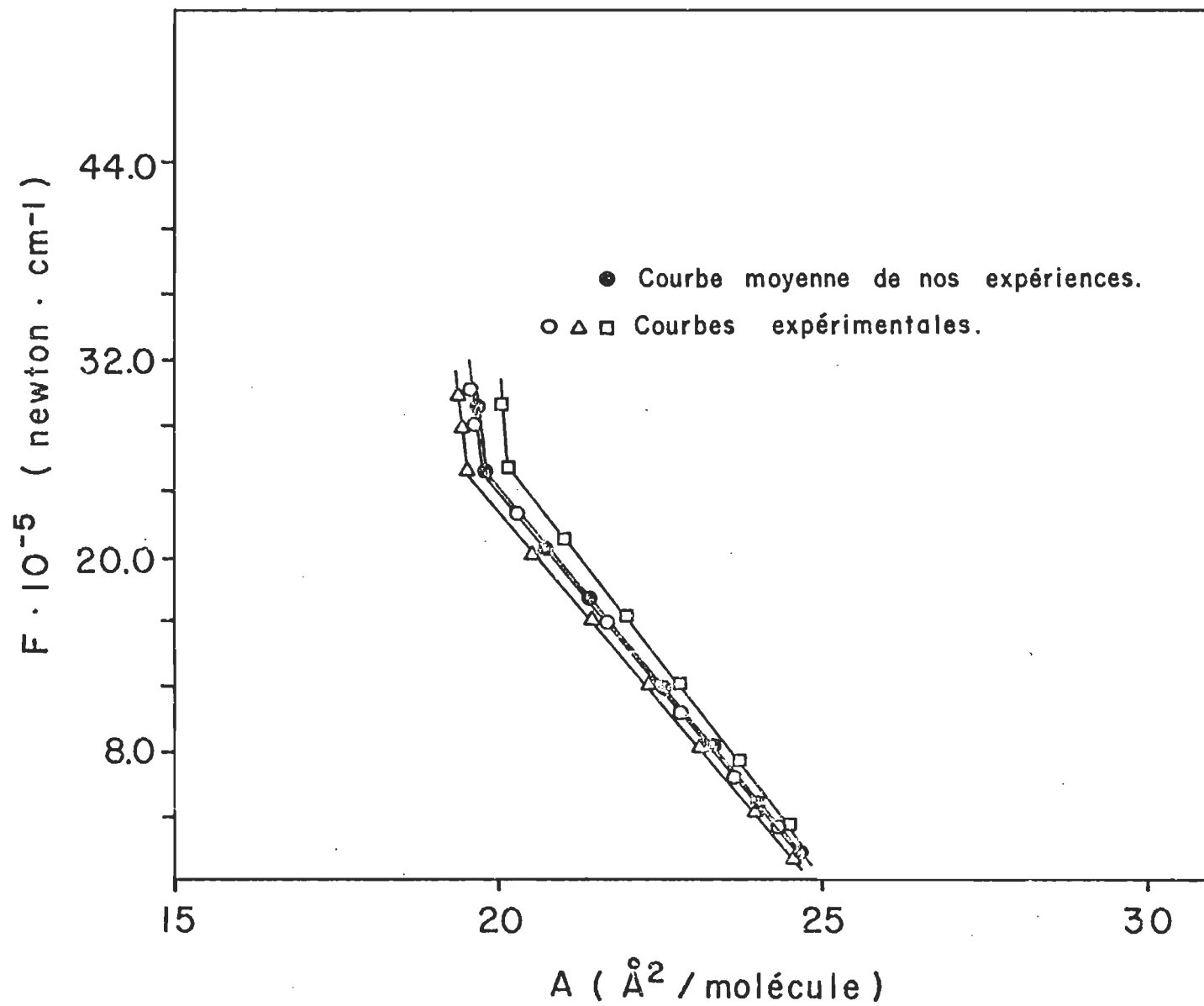
Graphique 6. Courbes de pression de surface du cholestérol.

de l'acide arachidique, nous avons déposé sur du chlorure de cadmium $10^{-4}M$ tandis que pour l'acide stéarique sur du HCl $10^{-2}M$. La compression est faite automatiquement à une vitesse de 1.0 cm par minute que l'on diminue à 0.8 cm par minute dans les fortes pressions de surface.

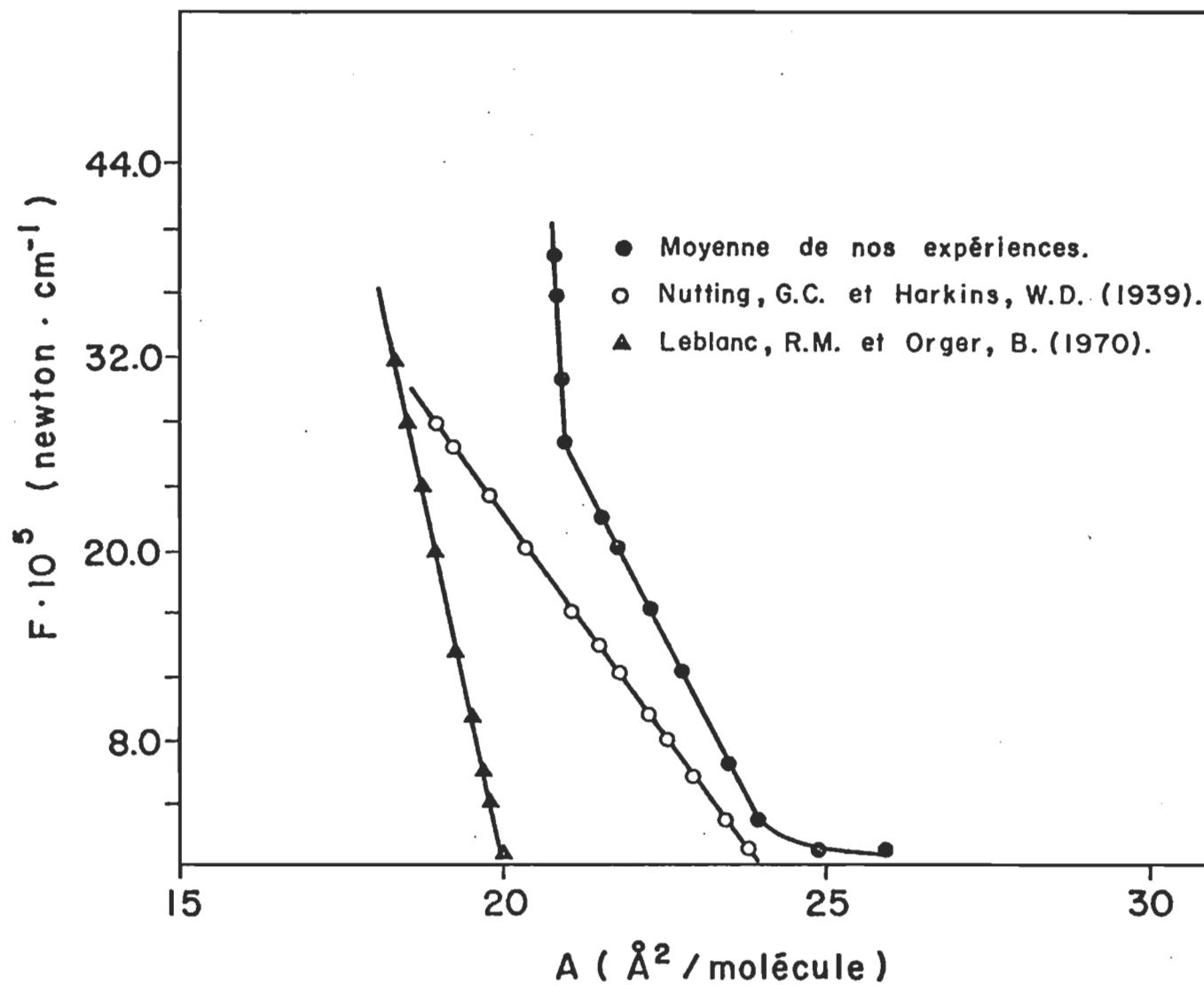
Chacune de nos courbes moyennes ont été comparées avec les résultats publiés. Sur le graphique #8, nous avons les résultats pour l'acide arachidique et sur le graphique #9 pour l'acide stéarique.

Dans le cas de l'acide arachidique nous obtenons, après extrapolation, une aire moléculaire de 20.8 \AA^2 comparativement à 20.0 \AA^2 pour Nutting, G.C. et coll. (1939). Pour l'acide stéarique les courbes obtenues sont montrées sur le graphique #7, p. 112. La moyenne (M) y est aussi ajoutée (cercles noirs). Cette dernière, si on la compare à celles du graphique #9, p. 114, nous semble très correcte. En fait elle tombe dans les limites d'incertitude de notre expérience. Si l'on extrapole la droite aux très fortes pressions 20×10^{-5} newton/cm (dyne/cm), nous obtenons une valeur de 20.5 \AA^2 par molécule.

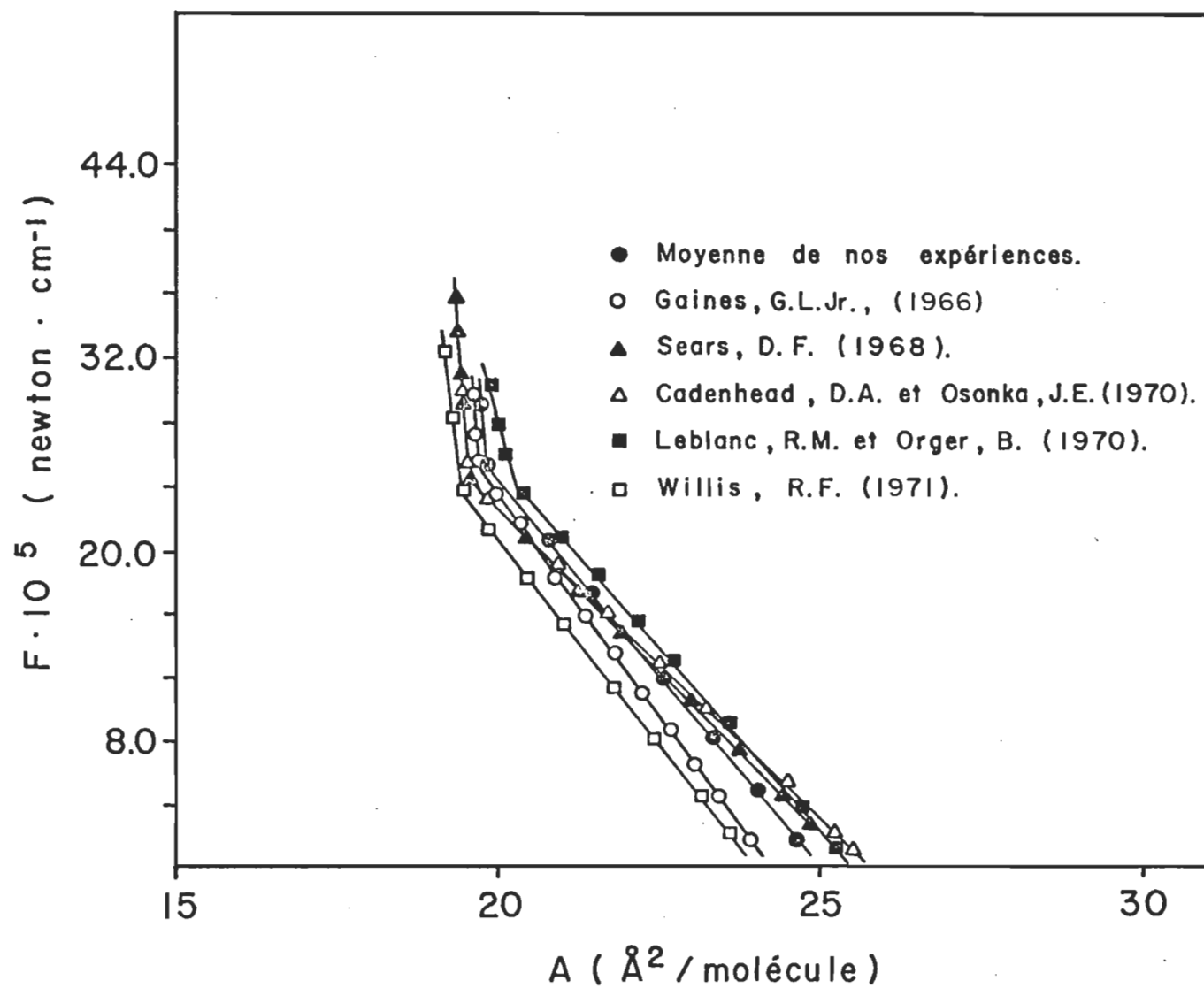
Si l'on rapporte nos valeurs d'aire moléculaire sur le tableau #6 p. 115 représentant également les valeurs de référence, nous pouvons conclure que l'eau et le système que nous utilisons fonctionnent parfaitement. Il est évident qu'une variation de 1.3 \AA^2 pour le cholestérol, de 0.8 \AA^2 pour l'acide arachidique et de 0.5 \AA^2 pour l'acide stéarique ne sont que des erreurs dues soit aux variations de température, de pression exercée sur le film ou de stabilité du film et autres, hors de notre contrôle. De toute évidence, nous pouvons passer maintenant à l'étalement des protéines à l'interface air/eau.



Graphique 7. Courbes de pression de surface de l'acide stéarique.



Graphique 8. Courbes de pression de surface de l'acide arachidique sur une sous-phase de chlorure de cadmium (10^{-4} M).



Graphique 9. Courbes de pression de surface de l'acide stéarique selon différents auteurs et comparaison avec notre courbe moyenne.

TABLEAU 6

Comparaison des aires moléculaires expérimentales obtenues pour le cholestérol, l'acide arachidique et l'acide stéarique en fonction des valeurs de références.

Substance	Solvant	Aire moléculaire (\AA^2 par molécule)	
		Références	Présent travail
Cholestérol	Diéthyléther	38.7 (Leblanc '70)	40.0
Acide arachidique	Diéthyléther	20.0 (Nutting '39)	20.8
Acide stéarique	Diéthyléther	20.0 (Willis '71)	20.5

Courbe de pression de surface des protéines

Etant donné que notre intérêt est surtout à faible pression de surface, nous donnerons donc l'allure des courbes sans prendre en considération le collapse mais bien plutôt la surface occupée pour une force appliquée de 5×10^{-5} newton/cm (dyne/cm). On considère par cette observation l'état de la protéine à l'interface air/eau.

Afin de rendre plus évidentes les valeurs obtenues par différents auteurs, et nous permettre une comparaison rapide, nous avons tracé un tableau récapitulatif pour les protéines utilisées (voir tableau #7 p. 127). Ce tableau nous indique également le solvant et la sous-phase employée.

Albumine de bovin

Conditions expérimentales

déposition: 0.50 ml en 2:30 min.

solvant: H₂O pH 5.0 - 5.2

concentration: 0.043 mg/ml

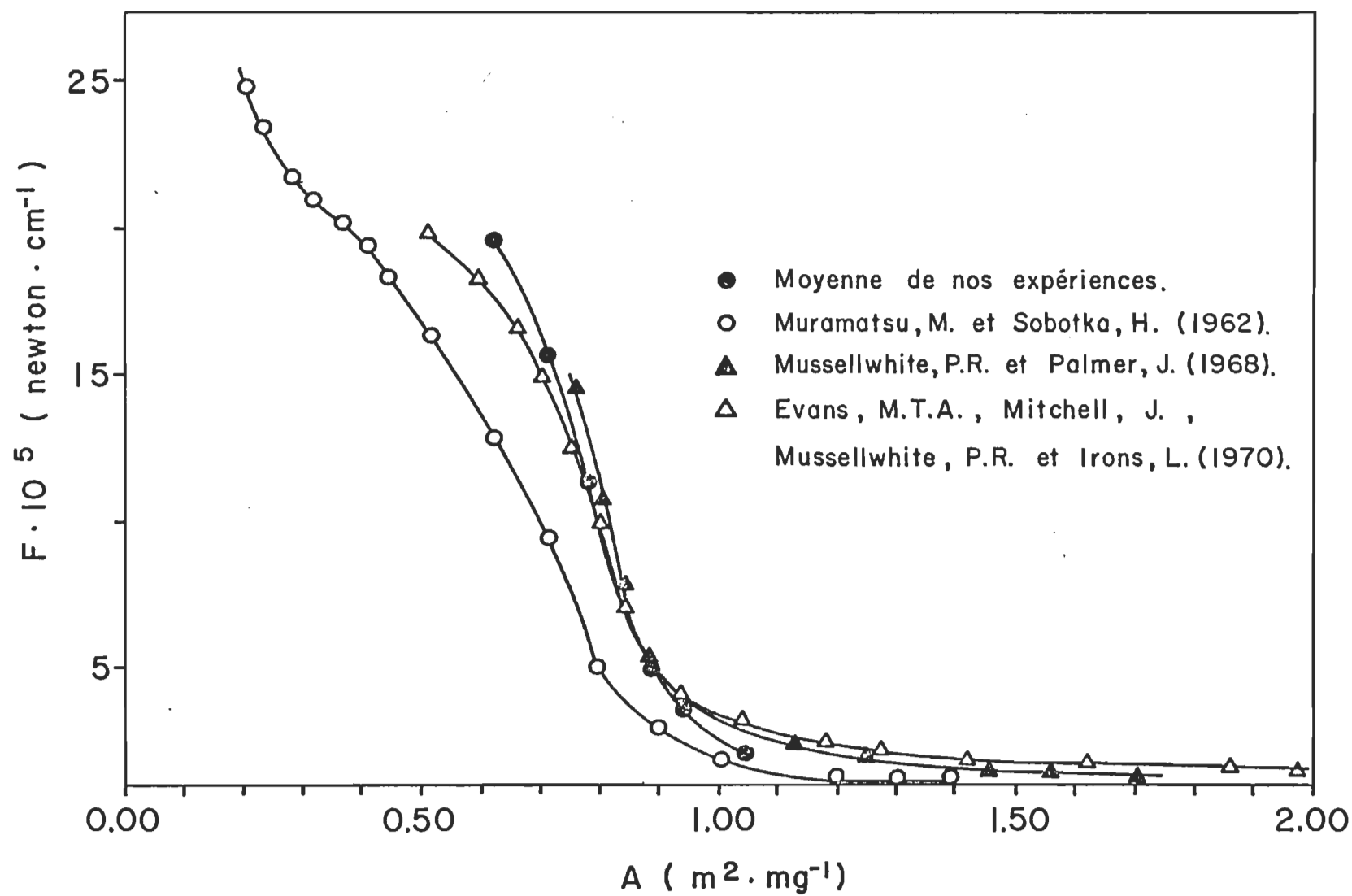
température: 295⁰K

sous-phase: tampon tris 0.1 mM pH: 5.2

vitesse de compression: 1 cm par min.

La courbe moyenne des isothermes de pression de surface montrée sur le graphe #10, que nous avons obtenue, correspond à celles décrites par différents auteurs, entre autres Muramatsu, M. et Sobotka, H. (1962), Muschelwhite, P.R. et coll. (1968), Evans, M.T.A. et coll. (1970) et Trillo, J.M., Fernandez, S.G. et Pedrero, P.S. (1971) (voir graphique #10). Nous avons obtenu, comme ces auteurs, une valeur de 0.89 m²/mg à 5 x 10⁻⁵ newton/cm (dyne/cm). Donc, on retrouve l'albumine de bovin étendue à la surface mais conservant une faible flexibilité et une grande orientation qui entraîne une surface relativement faible par rapport à 1.8 m²/mg, correspondant à la valeur calculée pour la surface occupée par une chaîne peptidique (Bull, H.B. (1950)). Cette valeur de 1.8 m²/mg est relative à toutes protéines donc la base dans l'étude de l'état de la protéine comme nous l'avons déjà mentionné dans l'introduction (p. 5).

On considère que notre protéine est native et qu'elle s'étend uniformément à la surface selon la méthode de Trurnit, H.J. (1960).



Graphique 10. Courbes de pression de surface de l'albumine de bovin.

G actine (muscle de lapin)Conditions expérimentales

déposition: 0.60 ml en 3:00 min

solvant: ATP 0.5 mM

CaCl₂ 1 mM

pH: 6.0

KCl 0.1 M

Tampon tris 25 mM

sous-phase: ATP 0.2 mM

CaCl₂ 1 mM

pH: 6.0

Tampon tris HCl 25 mM

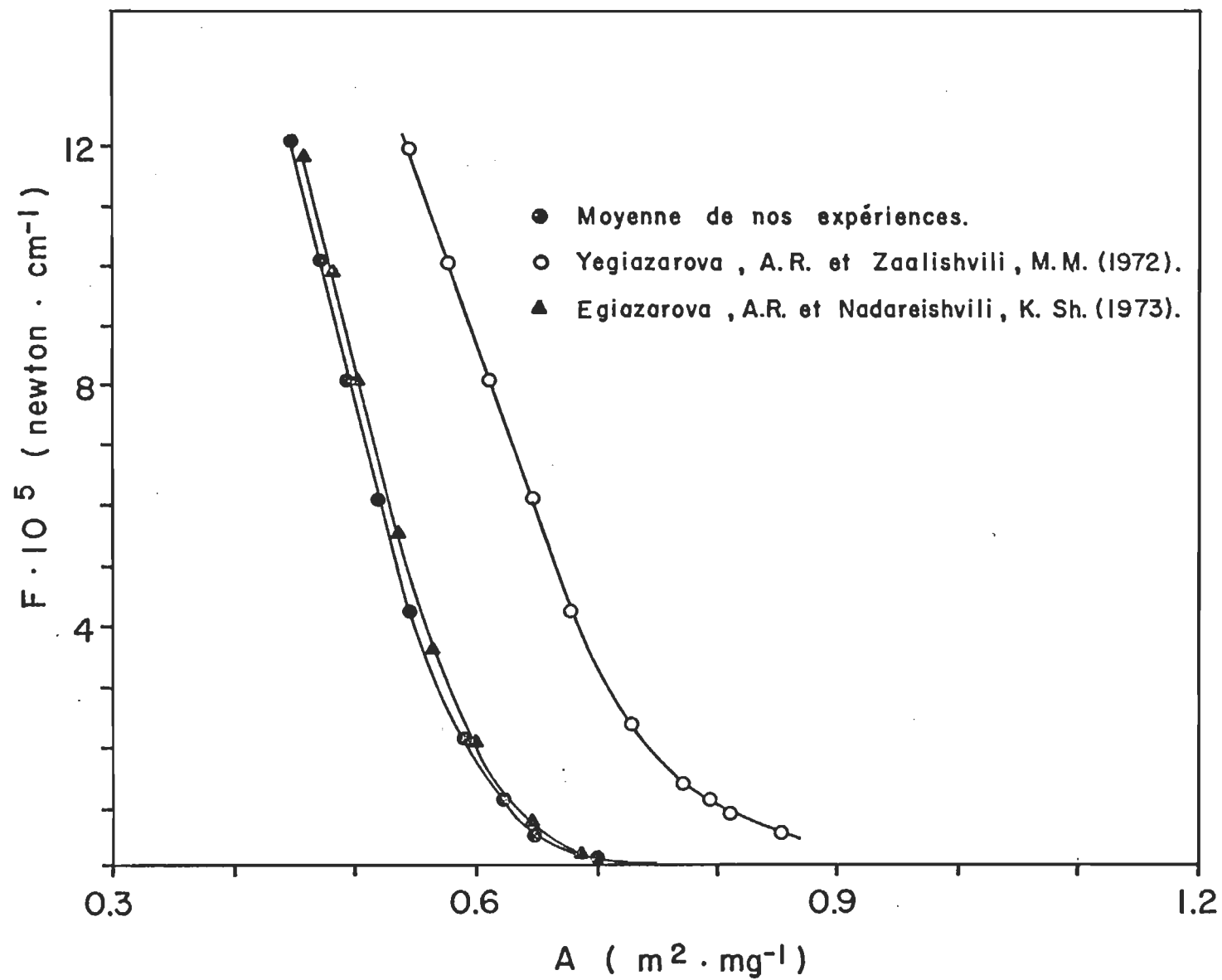
concentration: 0.072 mg/ml

température: 296°K

vitesse de compression: 1 cm par min

La courbe moyenne de nos expériences sur le graphique #11 comparée à celle d'Egiazarova, A.R. et coll. (1972) ou celle de Egiozarova, A.R. et coll. (1973) nous permet de dire que notre protéine est native et que probablement dû au nombre de groupements S-S elle se retrouve plus compacte que l'albumine. Il est certain que dans cette condition on ne peut affirmer si nous sommes en présence de dimère. Cette dernière probabilité peut être confirmée ou réfutée par les monocouches de G actine à faible pression de surface. Il sera très intéressant de voir ce qu'il en est dans la partie suivante du travail.

Donc, la G actine que nous avons extraite et purifiée semble se comporter de façon idéale à l'interface air/eau.



Graphique 11. Courbes de pression de surface de la G actine.

Cytochrome c (coeur de cheval)

Conditions expérimentales

déposition: 1.00 ml en 5:00 min.

solvant: Tampon carbonate 1 mM pH: 10.0

sous-phase: Tampon carbonate 1 mM pH: 10.0

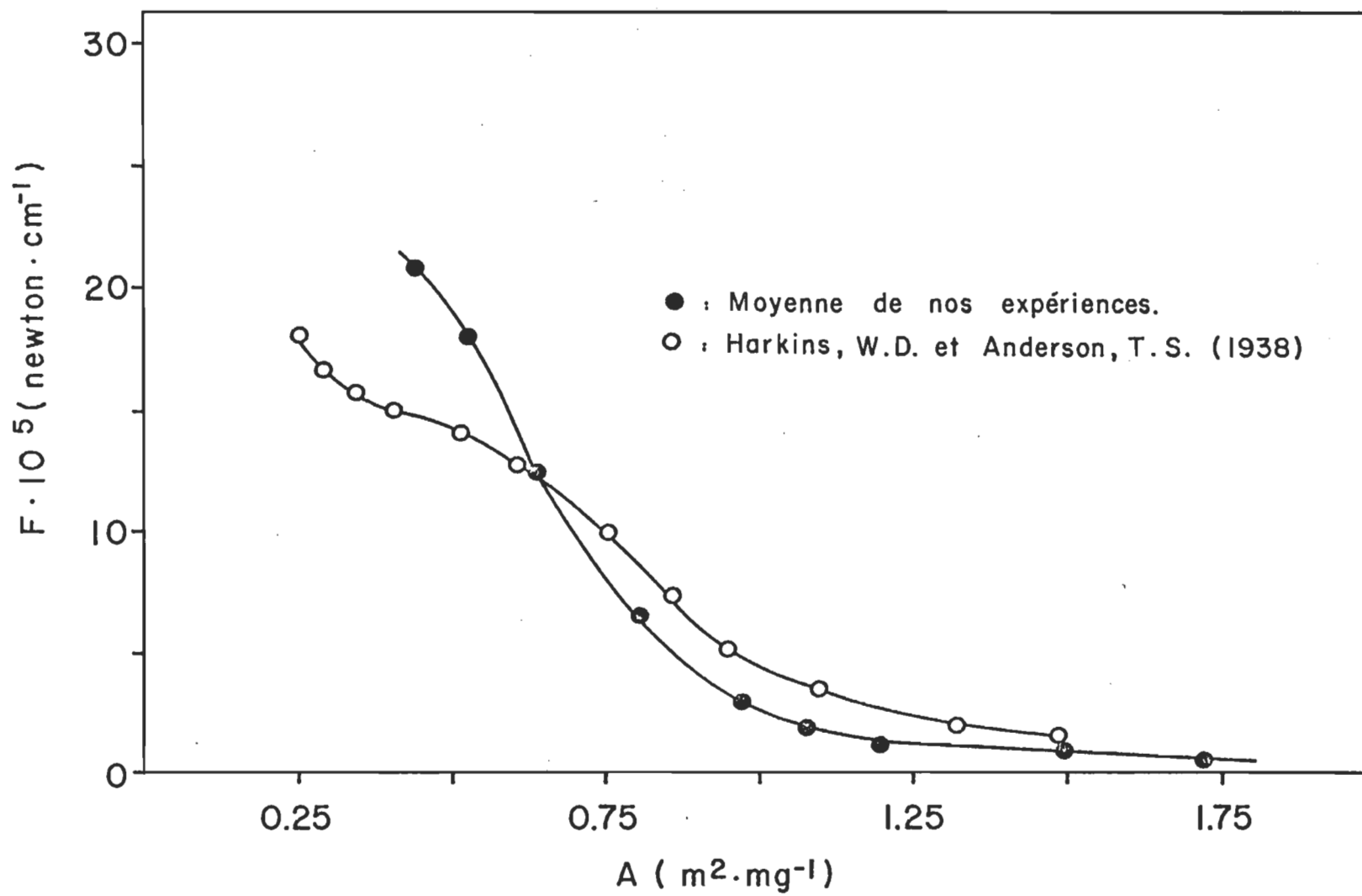
concentration: 0.10 mg/ml

température: 296.5°K

vitesse de compression: 1 cm par min.

Le cytochrome c est très stable comme l'albumine et la G actine donc après déposition on compresse après une attente d'environ 15 minutes. On remarque qu'il n'y a pas de changement dans ce laps de temps, mais si l'on augmente ce temps nous obtenons une courbe de pression de surface décalée (graphique #12) en comparaison à celle originale ou de Harkins, W.D. et Anderson, T.F. (1938). Ces derniers ont obtenu une valeur de $0.95 \text{ m}^2/\text{mg}$ à 5×10^{-5} newton/cm (dyne/cm) comparativement à 0.86 dans notre cas. Cette grande différence est très significative puisque notre méthode d'étalement, étant différente de la sienne et plus adaptée, nous permet de dire que notre perte de protéine à l'interface air/eau est inférieure à 0.5% mais dans le cas d'Harkins en 1938, nous ne pouvons conclure. Pour nous, il est évident que nous pouvons continuer le travail avec cette protéine et passer à faible pression de surface.

Comme dans les cas précédents, nous ne pouvons déterminer si notre cytochrome c se dimérise ou polymérise à l'interface air/eau. Il en sera donc question plus loin dans le travail à faible pression de surface.



Graphique 12. Courbes de pression de surface du cytochrome c.

Ovalbumine

Conditions expérimentales

déposition: 1.00 ml en 5:00 min.

solvant: H₂O pH: 5.0 - 5.3

sous-phase: acétate de sodium 5.0 mM

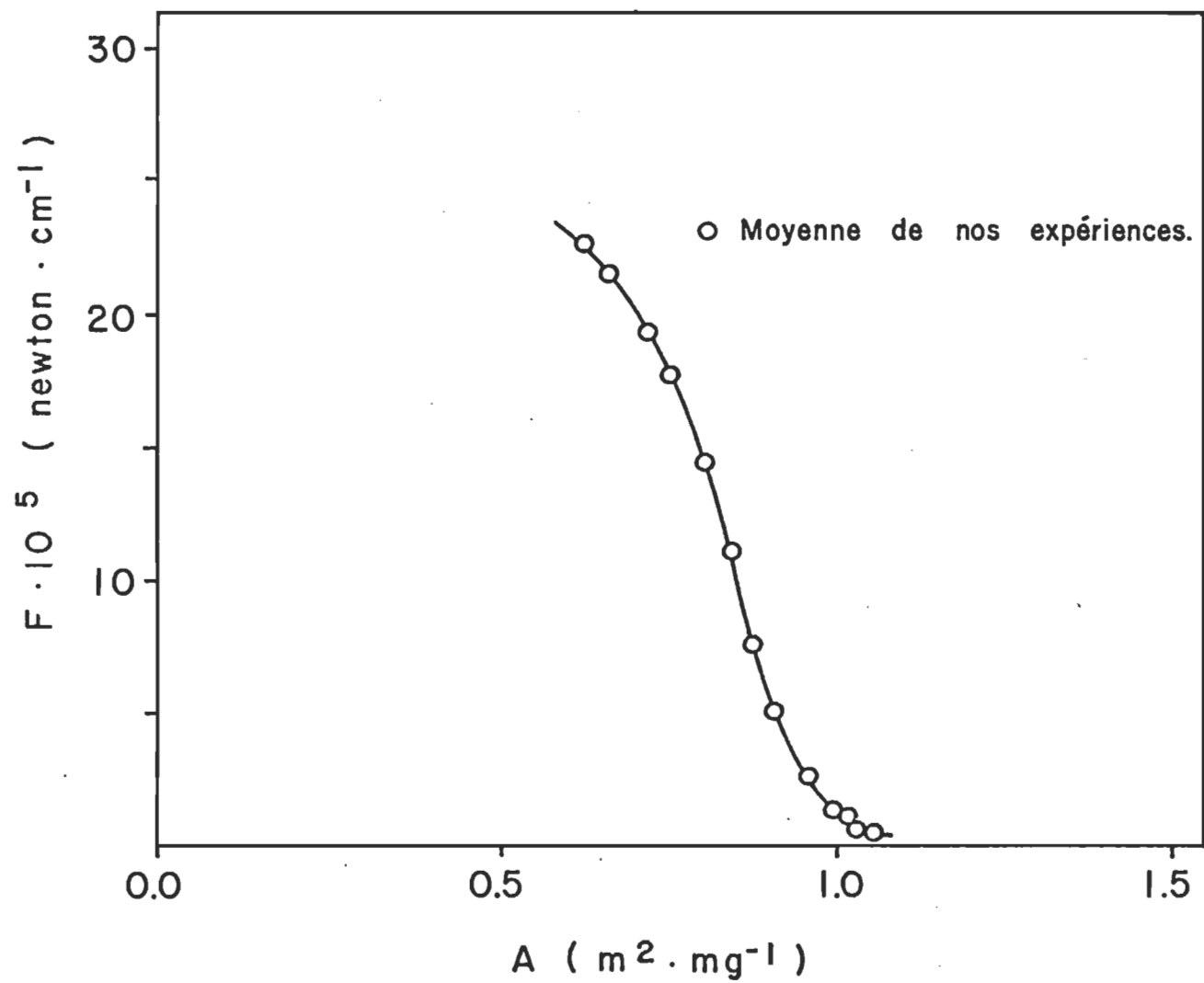
concentration: 0.04 mg/ml

température: 296°K

vitesse de compression: 1 cm par min.

L'ovalbumine est très dépendante de la sous-phase. Le tableau #7 (p. 127) nous démontre que la surface occupée à 5×10^{-5} newton/cm (dyne/cm) est relative à la sous-phase et toujours la même si l'on travaille en présence de sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄ 20%) quel que soit le pH. Nous avons choisi, malgré ce problème, les mêmes conditions que Bull, H.B. (1938) et avons obtenu une surface de 0.92 m²/mg comme en présence de sulfate d'ammonium 20% (graphique #13). L'ovalbumine étant très stable, dans ces conditions, nous compressons après une attente de quinze minutes afin de permettre un étalement uniforme. Toutefois, afin de vraiment constater la stabilité selon différentes expériences, on se base sur les travaux de Bull, H.B. et Neurath, H. (1937) qui ont vraiment fait un travail élaboré dans ce sens.

Comme nous l'avons déjà mentionné, nous vérifions seulement si la protéine est native puis, nous passons à faible pression pour la détermination du poids moléculaire. Dans le cas présent, on constate que l'ovalbumine répond d'une façon adéquate et que la surface occupée par molécule étant grande comparativement à l'albumine de bovin, ceci nous indique une moins grande flexibilité de la molécule.



Graphique 13. Courbe de pression de surface de l'ovalbumine.

Rhodopsine de bovin

Conditions expérimentales

déposition: 0.1 ml

solvant: Tampon tris, HCl 0.2 mM

Triton X-100 0.05%

sous-phase: H₂O pH: 5.0 - 5.2 ou Tris HCl pH: 5.8

concentration: 0.42 mg/ml

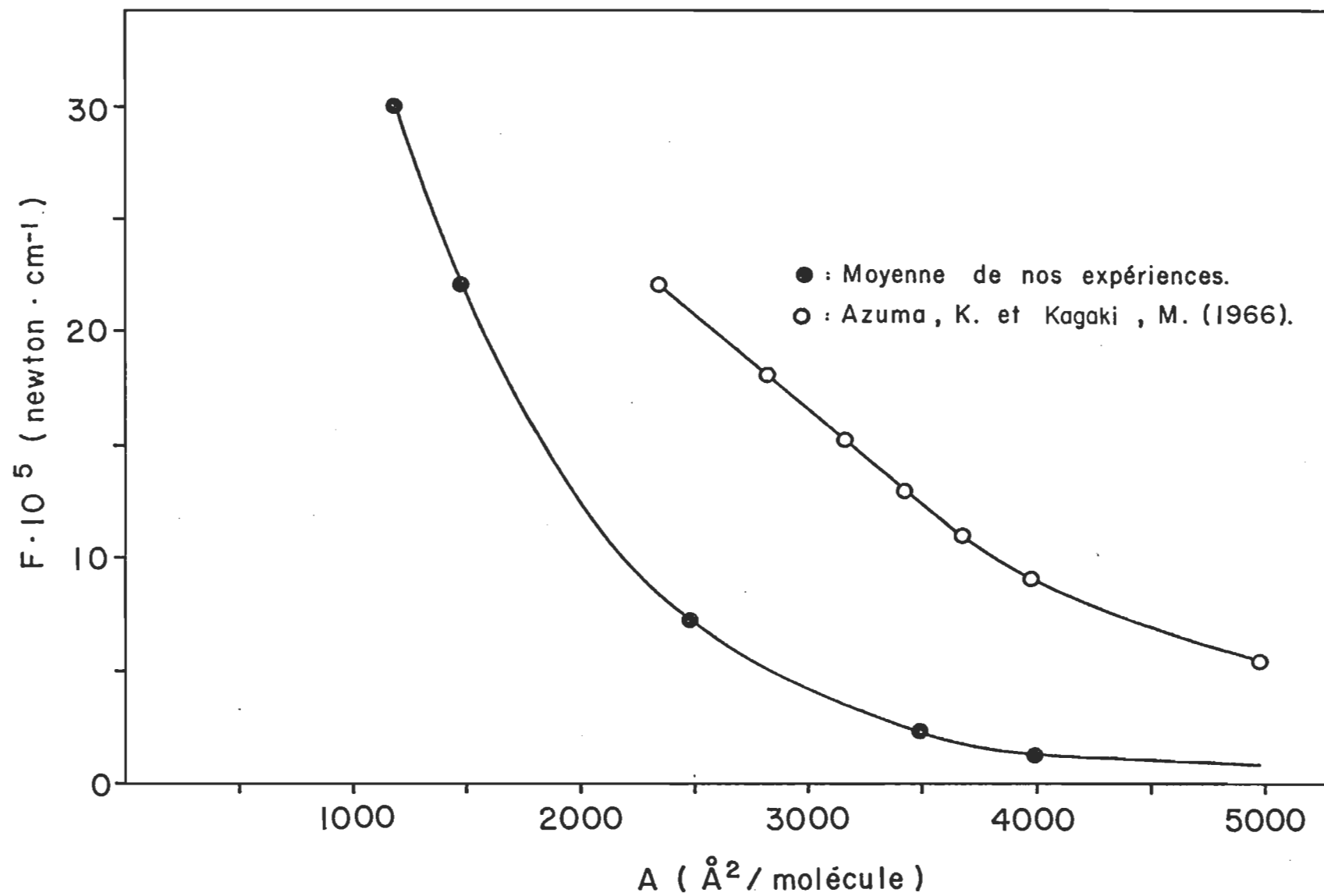
température: 296°K

vitesse de compression: 1 cm par min.

La courbe de pression de surface de la rhodopsine est montrée sur le graphique #14, p. 125. L'aire moléculaire occupée à 5×10^{-5} newton/cm (dyne/cm) est de 2800 \AA^2 . Mais n'oublions pas que notre solution contient 0.05% de Triton X-100 donc il faut examiner ces résultats avec objectivité. D'ailleurs, si l'on compare avec la valeur obtenue par Azuma, K. et Kagaki, M. (1966), qui était de l'ordre de 5000 \AA^2 , on comprend très bien l'influence du détergent et de la pureté de la protéine. Ces dernières valeurs si différentes s'expliquent du fait que notre rhodopsine avait une pureté de beaucoup supérieure à celle d'Azuma puisque nous avons obtenu un rapport spectral de 2 ± 0.1 contre 5 ± 1.5 .

Ce n'était là qu'un résultat préliminaire, pour la courbe de pression de surface, qui devra être confirmé par la suite. Due à la grande pureté de la rhodopsine, il sera donc très intéressant de travailler avec cette dernière en film gazeux.

Pour les courbes de pression de surface de toutes les protéines, il est important de noter que nous obtenons dans tous les cas un film liquide



Graphique 14. Courbes de pression de surface de la rhodopsine.

aux fortes pressions de surface, comparativement aux acides gras qui nous donnent une phase solide. Donc, il est important de considérer que la surface moléculaire est celle obtenue pour une monocouche qui n'est pas complètement rigide. On considère quand même le film comme étant compacte dû à la flexibilité de la protéine qui à notre avis entraîne toujours une certaine instabilité.

Tableau 7. Différentes sous-phases utilisées pour les protéines, le pH, la température, la surface occupée en m^2/mg à 5×10^{-5} newton/cm (dyne/cm) ainsi que l'endroit approximatif où se situe le collapse.

Protéine	Sous-phase	$t^\circ\text{C}$	pH Sous-phase	Solvant	$5 \times 10^{-5} \frac{\text{m}^2}{\text{mg}}$ newton/cm	10^{-5} Collapse newton/cm	Référence
Albumine de bovin	acetate de Na 0.5 N		4.8	H_2O pH 4.8	0.74		Neurath, H. (1936)
Albumine de bovin				0.5% (v/v) alcool amilique	0.84	16	Dervichian, D.G. (1939)
Albumine de bovin	0.15 N NaCl	20°C		60% alcool propi- lique 9.5 N acetate Na	0.89	16	Stallberg, S. & Theorell, T. (1939)
Albumine de bovin	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 35%	22°C	5.0		0.82 - 0.85	16	Bull, H.B. (1945-1946-1950)
Albumine de bovin	H_2O			H_2O	0.83	16	Trurnit, H.J. (1960)
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5-35%				0.83	16	
	0.1 N HCl	$20-21^\circ\text{C}$			0.90	17	
Albumine de bovin	H_2O		5.0	H_2O pH 5	0.89	18	Muramatsu, M. et Sobotka, H. (1962)
	NaCl ou KCl 0.5 M alcool isoamilique 0.5% v/v 0.01°C		5.0	NaCl ou KCl 0.5 M	0.89	24	
Albumine de bovin	H_2O	25°C 20°C 5°C	5.5			1.4% collapse à 5×10^{-5} newton/cm - 20°C	McRitchie, F. (1963)
						13.9% collapse à 5×10^{-5} newton/cm - 20°C	

Protéine	Sous-phase	t°C	pH Sous-phase	Solvant	$\frac{m^2}{mg}$ 5×10^{-2} newton/cm	10^{-5} Collapse newton/cm	Référence
Albumine de bovin	(NH ₄) ₂ SO ₄ 25%	25°C 20°C 5°C	5.5			0.34% collapsé à 5×10^{-5} newton/cm - 25°C 3.3% collapsé à 20×10^{-5} newton/cm - 25°C	MacRitchie, F. (1972)
Albumine de bovin	tampon phosphate NaCl 0.1 M	22°C	7.0	tampon phosphate	0.89	15	Musselwhite, P.R. & Palmer, J. (1968)
Albumine de bovin	tampon phosphate 0.1 M	25°C	6.8	H ₂ O			Blank, M. (1969)
Albumine de bovin	tampon phosphate	25°C	7.0		0.89	18	Evans, M.T.A., Mitchell, J., Musselwhite, P.R. & Irons, L. (1970)
Albumine de bovin	H ₂ O		6.0	KCl 0.5 M	0.15	20	Trillo, M.J., Fernandez, S.G. & Pedrero, P.S. (1971)
				tampon phosphate pH 7, H ₂ O	0.35	20	
					0.45	20	
				acétate de Na 0.5 M dans 60% (v/v) alcool isopropilique	0.60	20	
				alcool amillique 0.5%	0.80	18	

Protéine	Sous-phase	t°C	pH Sous-phase	Solvant	$\frac{m^2}{5 \times 10^{-5} \text{ mg newton/cm}}$	10^{-5} Collapse newton/cm	Référence
Albumine de bovin	tampon phosphate KCl 0.5 M alcool amilique 0.5% H ₂ O u: 0.1 u: 1 u: 2 u: 3		7.0	H ₂ O pH 6.0	0.68	18	Trillo, M.J. et coll. (1971)
				"	0.75	17	
				"	0.78	17	
				"	0.80	17	
				"	0.84	17	
				"	0.86	18	
				"	0.90	21	
Albumine de bovin	H ₂ O	24°C		0.5% 1-pentanol			Rosano, H.L., Chen, S.H., et Whittam, J.H. (1974)
Albumine de bovin	tampon tris 0.1 mM pH 5.2	22°C		H ₂ O pH 5.0	0.89	20	Munger, G. (présent travail)
<u>G</u> actine	KCl 0.1 M			ATP 0.5 mM MgCl ₂ 1 mM KCl 0.1 M tampon phosphate 0.025 M	0.66		Yegiazarova, A.R. & Zaalishvili, M.M. (1972)
<u>G</u> actine	KCl 0.15 M	21°C			0.54		Egiazarova, A.R. & Nadareishvili, K. Sh. (1973)
<u>G</u> actine	ATP 0.05 mM CaCl ₂ 1 mM	23°C	6.0	ATP 0.2 mM CaCl ₂ 1 mM	0.54		Munger, G. (présent travail)
Cytochrome <u>c</u>	tampon tris HCl 25 mM		10.0	tampon tris HCl 25 mM	0.95	13	Harkins, W.D. & Anderson, T.F. (1938)

Protéine	Sous-phase	t°C	pH Sous-phase	Solvant	$5 \times 10^{-5} \frac{\text{m}^2}{\text{mg}}$ newton/cm	10^{-5} Collapse newton/cm	Référence
Cytochrome <u>c</u>				0.1 M NaHCO ₃ 10% éthanol pH 9.8			Erecinska, M. (1975)
Cytochrome <u>c</u>	tampon carbonate 1 mM	23.5°C	10.0	tampon carbonate 1 mM pH 10.0	0.86	16	Munger, G. (présent travail)
Ovalbumine	acétate Na 0.5 N				0.74		Fourt, L. & Smitt, F.O. (1936)
Ovalbumine	acétate Na 0.5 N		4.8	H ₂ O	0.95	18	Neurath, H. (1936)
Ovalbumine	acétate de Na 0.0066 N	24-25°C	4.9		0.95	18	Bull, H.B. (1938)
Ovalbumine	0.1 N HCl 20% (NH ₄) ₂ SO ₄	22°C 22°C	4.8 4.8	H ₂ O H ₂ O	0.80 0.80	23 23	Kashiwagi, M. (1959)
Ovalbumine		21°C		0.1% butanol H ₂ O (v/v)			Blank, M. (1969)
Ovalbumine	Na ₂ SO ₄ 1 M	24°C			0.80	18	Bull, H.B. (1972)
Ovalbumine			4.88	H ₂ O	0.89	18	Bull, H.B. & Neurath, H. (1937)
Ovalbumine	acétate de sodium 5.0 mM	23°C		H ₂ O pH 5.5	0.92	20	Munger, G. (présent travail)
Rhodopsine	0.15 M NaCl	28 ± 1°C			$1.8 \times 10^{-4} \frac{\text{Å}^2}{\text{molécule}}$	30	Azuma, K. & Kagaki, M. (1966)
Rhodopsine	H ₂ O tampon tris HCl	23°C	5.0-5.2 5.8	tampon tris HCl 0.2 mM triton X-100 0.05%			Kossi, C.N., Munger, G., & Leblanc, R.M. (1977)

Avec le transducteur magnétique linéaire

Nous avons déjà dit que le transducteur est utilisé dans le but de faciliter le travail de mesure. Nous prenons donc nos valeurs en voltage plutôt qu'en degré et nous utilisons un fil de torsion de diamètre plus gros.

Etalonnage

Ce dernier se fait comme dans le système précédent et la pente ($\frac{P}{V}$) nous permet de déterminer la sensibilité par la même formule:

$$S = \left(\frac{P}{V}\right) \times \frac{g}{T_f} \times \frac{l_c}{L} \quad v \text{ étant le voltage}$$

De façon générale, nous avons travaillé avec une sensibilité de 1.95×10^{-5} newton/cm V (dyne/cm V) pour un fil de torsion de 0.038 cm de diamètre. La courbe de calibration du graphique #15, p. 132 est caractéristique pour un fil de 0.038 cm de diamètre.

Différentes sensibilités, fonction du diamètre du fil, telles qu'indiquées dans le tableau #8, p. 133, ont été obtenues.

Standardisation

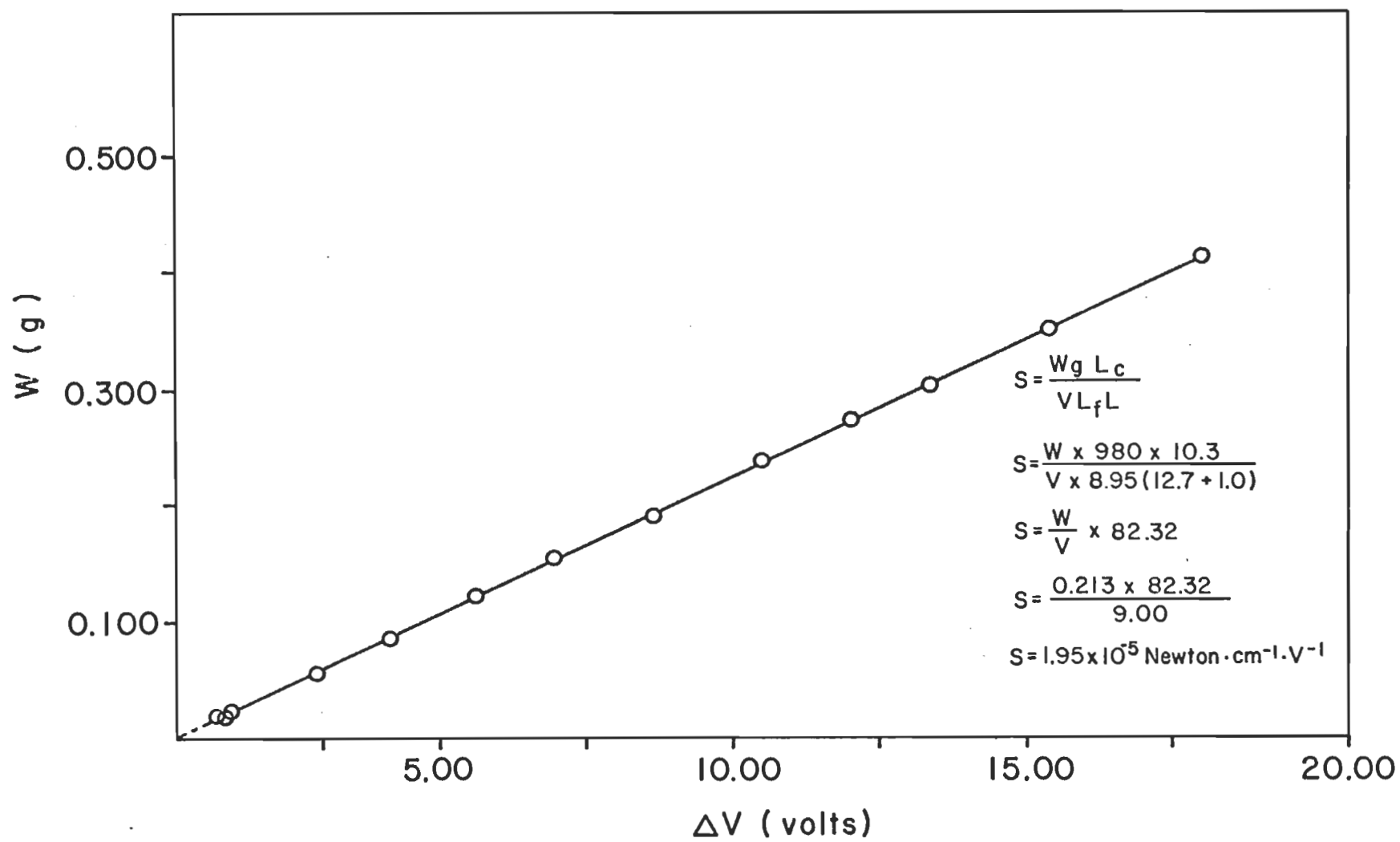
Dans le cas présent, nous avons fait une courbe standard avec le cholestérol et l'acide arachidique.

Cholestérol

Conditions expérimentales

déposition: 0.10 ml

solvant: n-hexane



Graphique 15. Calibration avec un fil de torsion de 0.038 cm de diamètre: système utilisant un transducteur magnétique linéaire.

TABLEAU 8

Sensibilité du système avec un transducteur magnétique linéaire suivant le diamètre du fil de torsion.

FIL	Diamètre (cm)	Sensibilité (newton/cm V)	Limites des pressions de surface (newton/cm)		
			minimum		maximum
Acier	0.038	2.39	0.20	-	45.00
	0.051	5.40	5.40	-	85.00
	0.077	24.1	9.60	-	50.0

Note: Comme dans le cas du système précédent, la sensibilité varie selon la tension exercée sur le fil de torsion.

sous-phase: $\text{HCl } 10^{-2} \text{ M}$

concentration: $1.210 \times 10^{-3} \text{ M}$

température: 296.5°K

vitesse de compression: 1.00 cm par min.

Si l'on extrapole la courbe du graphique #16, nous obtenons une aire moléculaire de 42.6 \AA^2 . Notre système répond donc très bien dans son ensemble étant donné la correspondance entre nos résultats et la mesure de référence (voir tableau #6 p.115) soit 42.6 \AA^2 comparé à 38.0 \AA^2 obtenu par Leblanc, R.M. et coll. (1970).

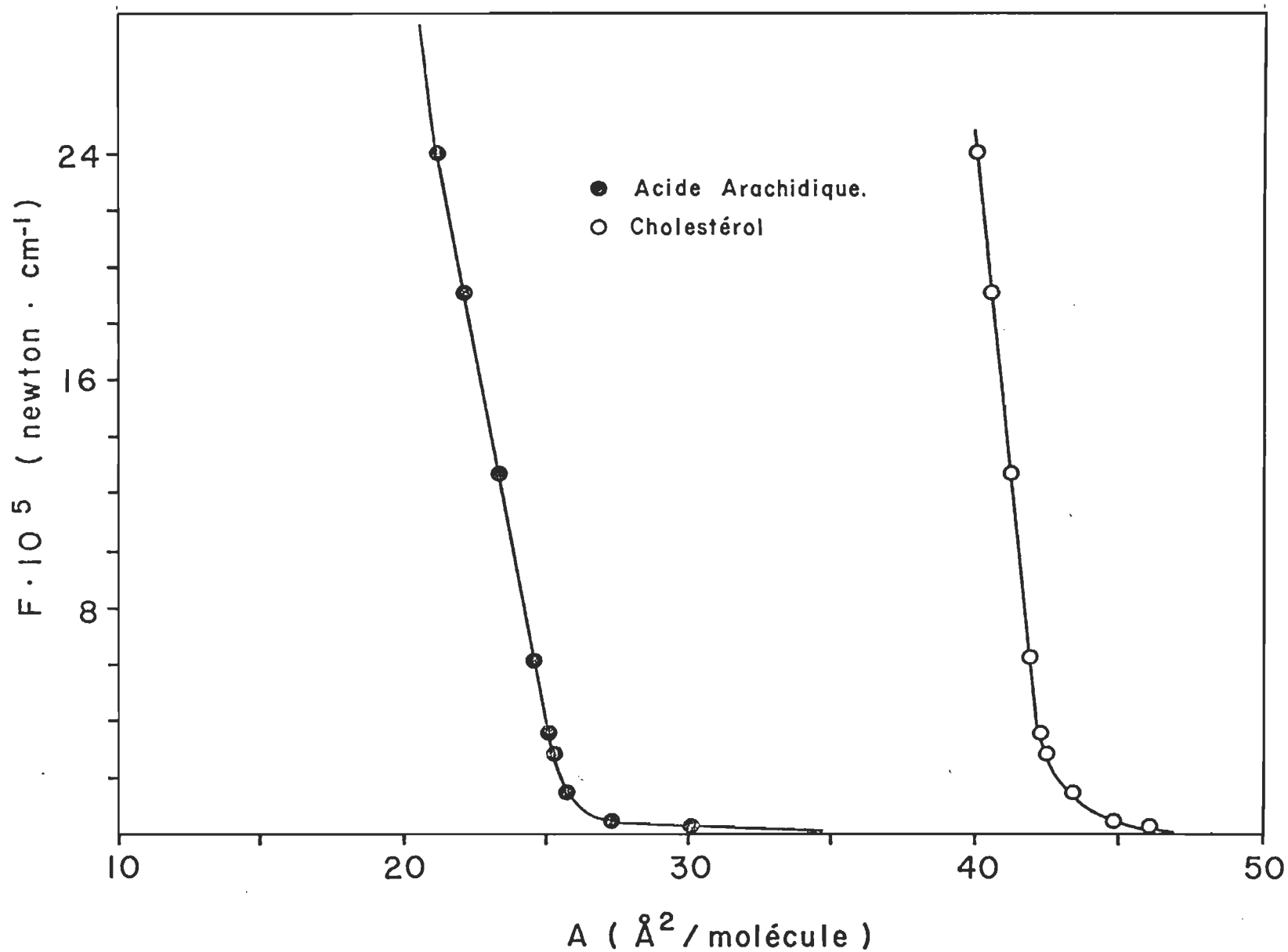
Acide arachidique

Conditions expérimentales

même chose que pour le cholestérol sauf

sous-phase: $\text{HCl } 10^{-3} \text{ M}$

concentration: $1.150 \times 10^{-3} \text{ M}$



Graphique 16. Courbes de pression de surface du cholestérol et de l'acide arachidique avec le transducteur. Fil de torsion de 0.038 cm de diamètre.

Comme pour le système de degré, il est difficile d'obtenir une aire moléculaire de 20 Å^2 pour l'acide arachidique dues aux conditions expérimentales. Nous avons obtenu une aire moléculaire de 21.5 Å^2 (à forte pression de surface), ce qui est excellent comparativement à ce que nous avons obtenu sur une sous-phase de chlorure de cadmium. Il nous semble donc inutile de faire d'autres mesures avec l'acide arachidique et le cholestérol puisque nos résultats correspondent à ceux de la littérature.

Pour les courbes de pression de surface des protéines, nous référons à la p. 115 de la partie du système à forte pression avec les degrés puisque les mesures ont été prises avec ce dernier.

Maintenant que nous avons constaté que l'ensemble des protéines nous donne un film stable à forte pression de surface et que l'aire moléculaire obtenue pour chacune d'elles est en accord avec celle de la littérature nous passerons donc à l'étude des poids moléculaires avec le système à faible pression de surface.

Système à faible pression de surface

Nous avons expliqué qu'il était impossible de travailler avec un système conventionnel à de faibles pressions, inférieures à 0.05×10^{-5} newton/cm (dyne/cm). Nous avons donc conçu un système avec les fibres optiques et voici les résultats obtenus avec ce dernier.

Etalonnage

L'équation utilisée est exactement la même que celle du transducteur magnétique linéaire. La différence est dans la sensibilité obtenue. Ainsi, on obtient une sensibilité de 0.143×10^{-5} newton/cm V (dyne/cm V) pour un fil de torsion ayant un diamètre de 0.033 cm.

$$S = \left(\frac{P}{V}\right) \times \frac{g}{l_f} \times \frac{l_c}{L}$$

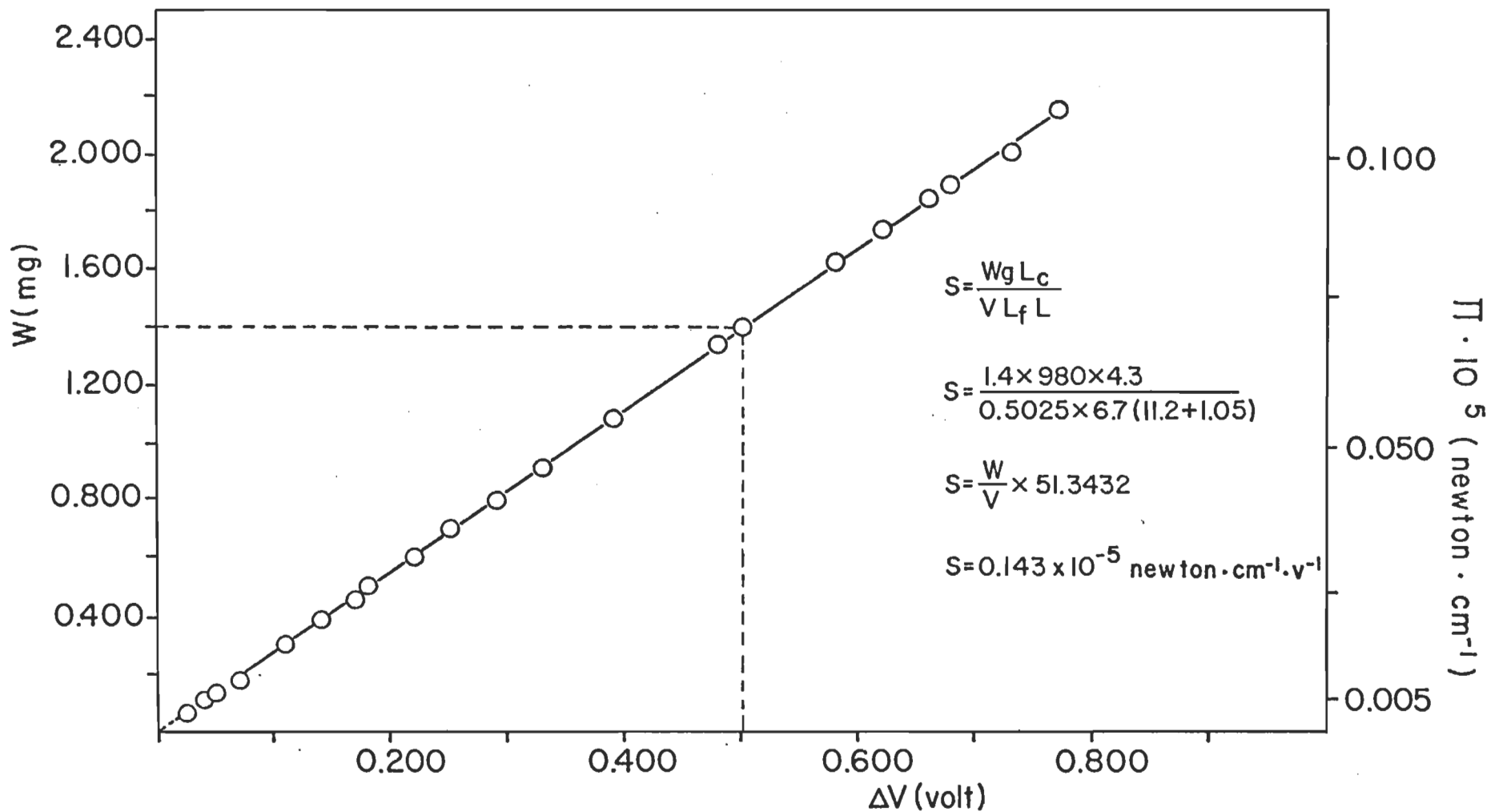
$$S = \frac{1.4 \times 10^{-3} \text{ g} \times 980 \text{ newton/g} \times 4.3 \text{ cm}}{0.5025 \text{ V} \times 6.70 \text{ cm} (11.20 \times 1.05) \text{ cm}}$$

$$S = 0.143 \times 10^{-5} \text{ newton/cm V (dyne/cm V)}$$

Le graphique #17, p. 137 représente très bien le type de courbe de calibration obtenue pour un tel montage. Ce dernier nous permet de travailler à des pressions variant de $0.001 - 0.111 \times 10^{-5}$ newton/cm (dyne/cm).

Plusieurs essais ont été faits avec des fils de différents diamètres et des tensions plus ou moins grandes appliquées sur le fil de torsion. Le graphique #18 nous donne la pente; les maxima et minima de pression applicables pour un fil de 0.038 cm de diamètre. Dans ce dernier cas, on constate que l'on peut travailler entre 0.005 et 0.217×10^{-5} newton/cm (dyne/cm) et il est très important de reprendre les expériences dans cette région si l'on découvre que notre substance ne donne pas une relation linéaire entre 0.001 et 0.010×10^{-5} newton/cm (dyne/cm). Il faut donc, d'après le diamètre du fil et sa tension, calibrer soigneusement afin d'éviter toute erreur dans les mesures.

De plus une calibration est nécessaire à chaque jour puisqu'il y a variation de la sensibilité selon le temps et surtout selon la tension appliquée sur le fil.



Graphique 17. Calibration avec un fil de torsion de 0.033 cm de diamètre: système à faible pression de surface.

Un autre point d'importance est le diamètre du fil. Si on utilise un diamètre de 0.030 cm, il est difficile d'obtenir une précision supérieure à 0.005×10^{-5} newton/cm (dyne/cm) car la stabilité du système devient impossible. Cette variation est produite par l'inertie du flotteur qui ne peut être stabilisée.

Nous avons de plus placé le système sur une table antivibration afin d'éliminer les vibrations naturelles inférieures à 10 Hz. Ce principe élimine les fluctuations du système provenant de l'inertie amenée par les vibrations à la masse d'eau (2.0 litres) dans le bain de monocouche. Cette inertie peut être diminuée en changeant le volume d'eau dans le bain soit environ 1 litre, il faut alors un bain d'une profondeur de 1.22 cm.

La calibration est une étape très délicate et doit être faite avec une très grande précision. Une fois que l'on a accompli ce travail, on passe à la standardisation.

Standardisation

Cette dernière ne pouvant être déterminée selon les méthodes conventionnelles soit par la courbe de pression de surface d'acide gras, on a donc pensé qu'il serait intéressant de le faire par la méthode des poids moléculaires. Donc si l'on parvient à déterminer de façon exacte le poids moléculaire de protéine, nous aurons ainsi standardisé notre système en plus d'avoir amélioré un principe mis au point par Guastalla, J. (1939a). Il faut pour ainsi dire passer à la détermination des poids moléculaires pour mettre au point le principe.

Détermination du poids moléculaire de protéines

On emploie les protéines dans les mêmes conditions que pour tracer les courbes de pression de surface mais en se servant des résultats, pour le solvant et la sous-phase, selon lesquels les valeurs de surface occupées en m^2/mg à 5×10^{-5} newton/cm (dyne/cm) ont été satisfaisantes i.e., correspondent à celles des références citées.

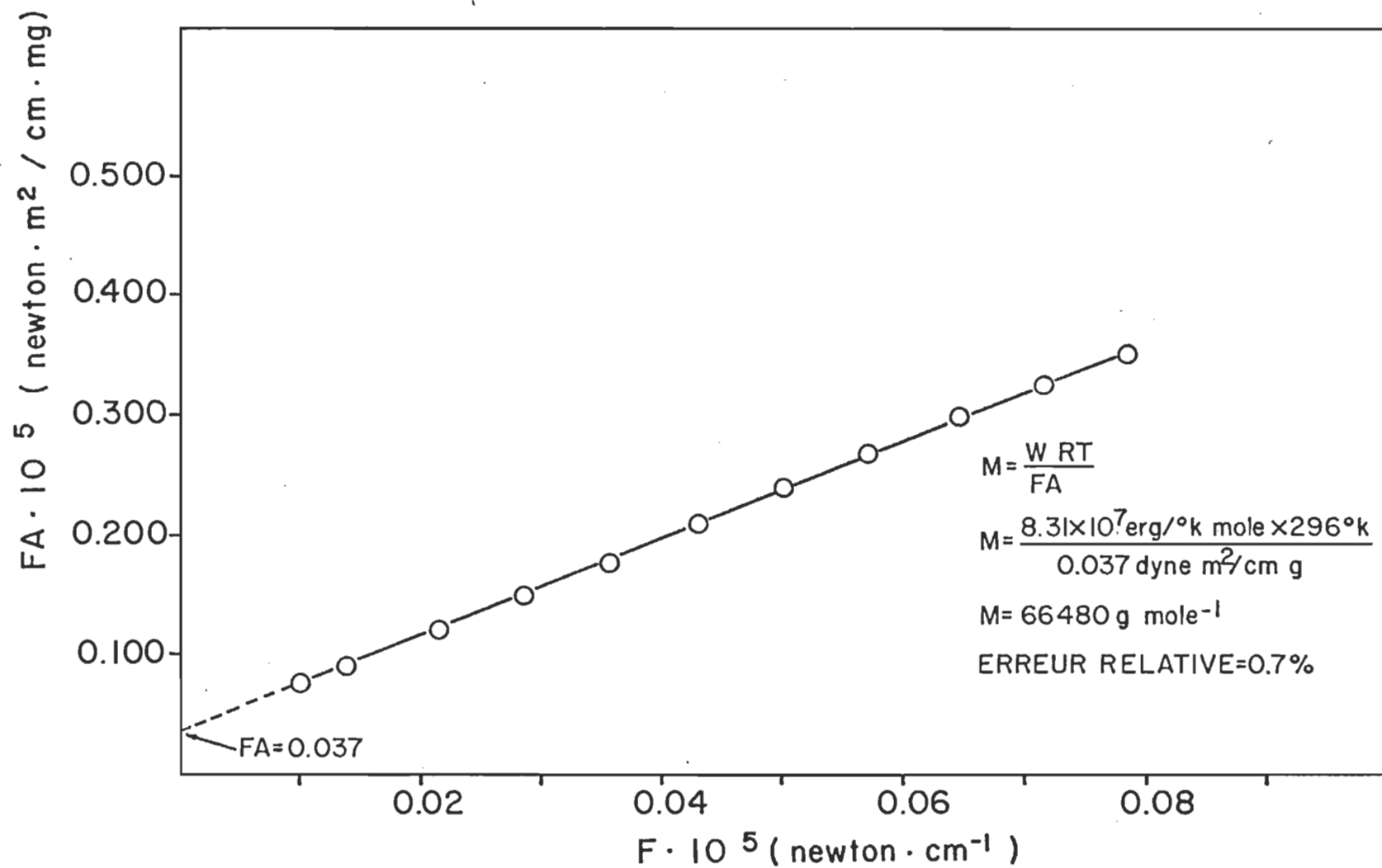
On dépose donc 1 ml ou moins, selon le cas, de protéine à l'interface air/eau par la méthode de Trurnit (voir p.68). Les concentrations sont habituellement de 0.04 mg/ml. Ensuite, on compresse de façon régulière soit 1 cm par minute et ce, pendant 15 - 20 minutes dépendant de la protéine.

Selon les résultats obtenus, on trace ensuite le graphe de FA newton $\text{m}^2/\text{cm mg}$ (dyne $\text{m}^2/\text{cm mg}$) en fonction de F newton/cm (dyne/cm). On extrapole la courbe sur l'axe des ordonnées et l'on retranscrit la valeur de FA obtenue dans l'équation en deux dimensions de Bull:

$$FA = nRT \quad (\text{voir pages 11 et 87})$$

De cette façon, on peut déterminer le poids moléculaire avec une très bonne précision.

Poids moléculaire de l'albumine de bovin. Donc selon les mêmes conditions que pour la courbe de pression de surface, nous avons obtenu la courbe représentée sur le graphique #19 pour l'albumine de bovin.



Graphique 19. Détermination du poids moléculaire de l'albumine de bovin: système à faible pression de surface.

La valeur de FA obtenue est de 0.037×10^{-5} newton $\text{m}^2/\text{cm mg}$ (dyne $\text{m}^2/\text{cm mg}$). En utilisant cette mesure dans l'équation:

$$M = \frac{WRT}{FA}$$

M: poids moléculaire

W: poids de la substance déposée

R: constante des gaz parfaits

T: température absolue

F: force appliquée

A: surface occupée

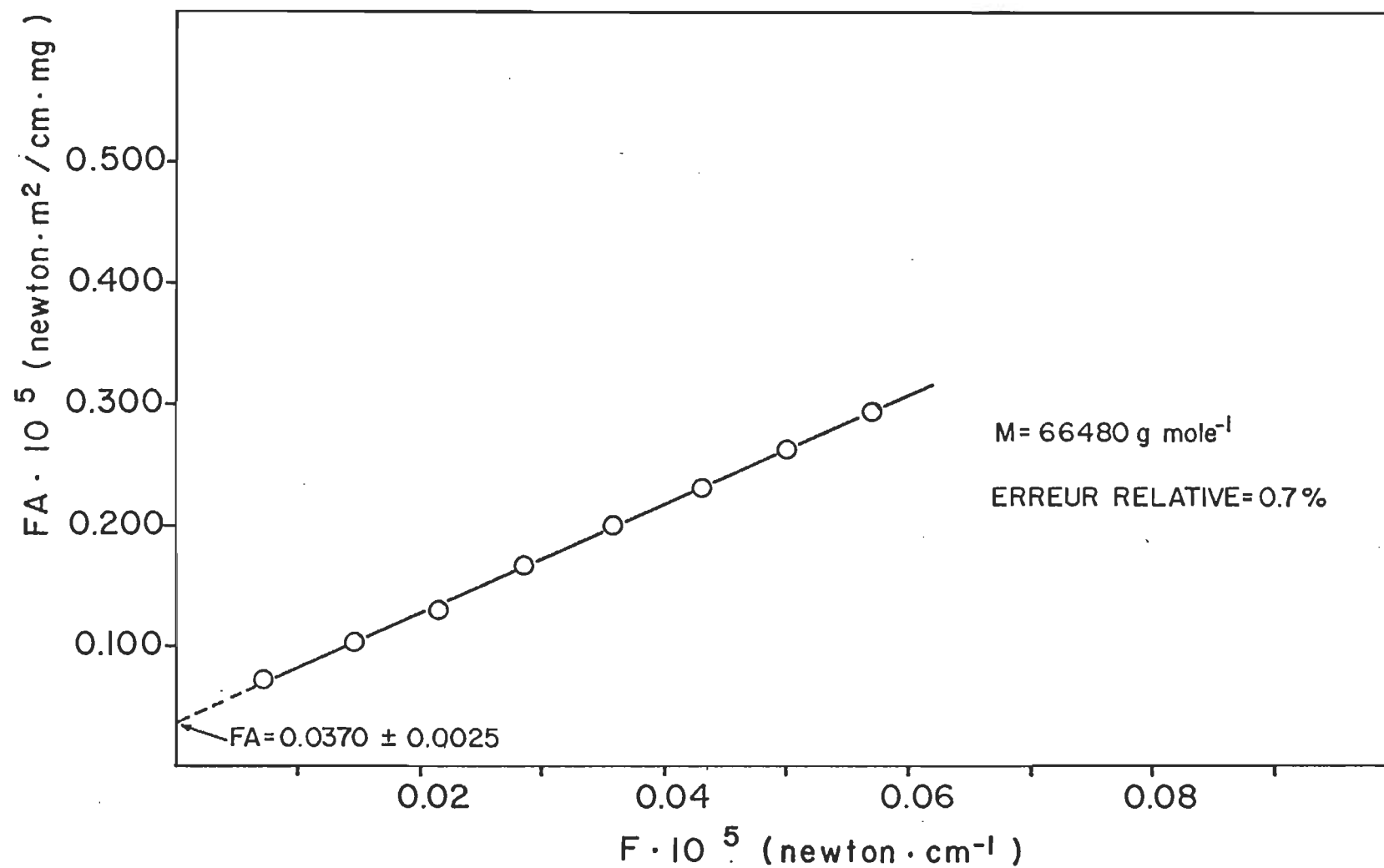
$$M = \frac{8.31 \times 10^7 \text{ erg/}^{\circ}\text{K mole} \times 296^{\circ}\text{K}}{0.037 \times 10^{-5} \text{ newton m}^2/\text{cm mg}}$$

$$M = 66480 \text{ g/mole}$$

Considérant que le poids moléculaire de l'albumine de bovin est de 66,000 selon sa composition en acide aminé, on obtient donc une erreur relative de 0.7% par rapport à la valeur exacte. Nous avons également considéré une nouvelle concentration (0.045 mg/ml comparativement à 0.043 mg/ml) et le résultat en fut le même comme le démontre le graphique #20, p. 143.

Comme nos résultats avec cette protéine furent très satisfaisants nous sommes passés à la G actine qui est beaucoup plus complexe.

Poids moléculaire de la G actine (muscle de lapin). Dans ce cas, les résultats obtenus à très faible pression de surface ne sont pas linéaires. Nous avons donc considéré les valeurs de pression dans la région linéaire soit de $0.100 - 0.400 \times 10^{-5}$ newton/cm (dyne/cm). De plus nous avons poussé notre étude en ajoutant de la phalloïdine qui avait donné des résultats importants pour la stabilisation.



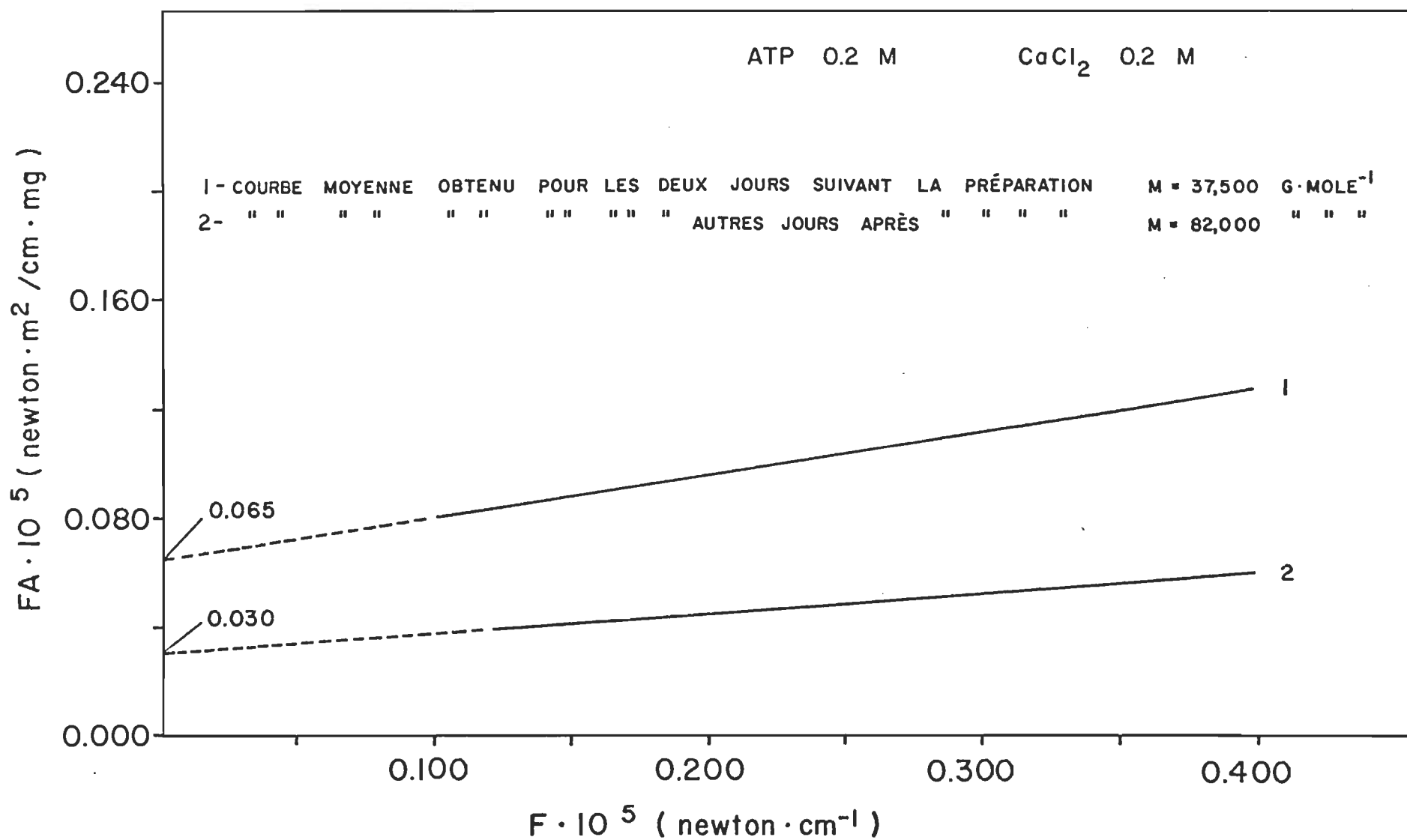
Graphique 20. Détermination du poids moléculaire de l'albumine de bovin: système à faible pression de surface. Effet de la concentration.

Nous avons donc tracé la moyenne des courbes obtenues pour les deux premiers jours puis pour les deux autres jours suivants.

Nous n'avons remarqué aucune différence avec ou sans utilisation de la phalloïdine, donc à faible pression et à l'état monomoléculaire il ne semble pas y avoir d'interaction molécule/molécule assez forte pour se lier et donner un dimère. Par contre, si l'on prend un échantillon âgé de deux jours et que l'on dépose à l'interface air/eau, nous obtenons un P.M. de 82,000, donc un dimère. On ne peut toutefois conclure avec certitude dans ce dernier cas puisque l'ATP se dégradant avec le temps peut causer cette augmentation du poids moléculaire puisque chaque molécule de protéine tend alors à se grouper par polymérisation.

Par contre un poids moléculaire de 37,500 a été déterminé pour les deux premiers jours (graphique #21). Nous obtenons donc une erreur relative de 12.8% en comparant avec le P.M. obtenu par la séquence des acides aminés déterminés par Elzinga, M. et coll. (1973) qui est de 42,300 g/mole. Il faut ajouter qu'il s'agit là de résultats préliminaires et que les méthodes de purification de cette protéine étant de beaucoup améliorées il sera plus facile de confirmer ce que nous avons déjà avancé.

Poids moléculaire du cytochrome c (coeur de cheval). Vues les différentes difficultés obtenues pour la G actine, il a été très intéressant de prendre le cytochrome c et de travailler à faible pression de surface. Il a déjà été mentionné que le cytochrome c est extrêmement stable et donc nous devrions obtenir de bons résultats. En effet, en traçant la courbe FA en fonction de F (graphique #22), nous avons pu déterminer en extrapolant à $F \rightarrow 0$ une valeur



Graphique 21. Détermination du poids moléculaire de la G actine: système à faible pression de surface.

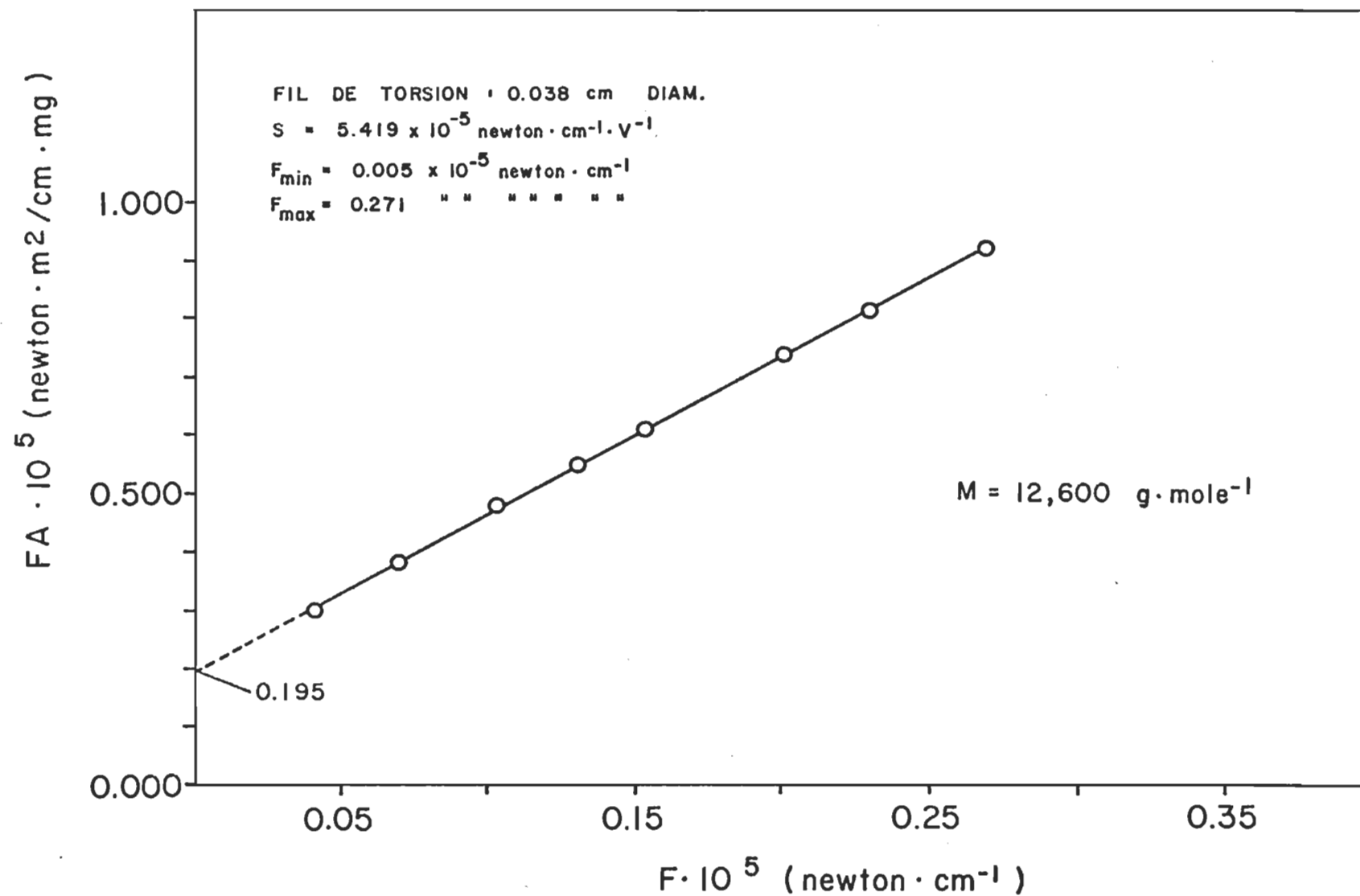
de 12,600 comme poids moléculaire. Le poids moléculaire déterminé par Wainio, W.W. (1970) est de 12,400 g/mole (voir tableau #10 p.159).

On constate donc que notre système peut très bien répondre dans les régions de faible P.M. et de fort P.M., soit le cytochrome c et l'albumine de bovin respectivement. Mais, il n'a pas été démontré que nous puissions travailler dans la région intermédiaire donc la prochaine étape fut d'utiliser l'ovalbumine puisque la G actine ne répond pas de façon tout à fait linéaire à faible pression de surface.

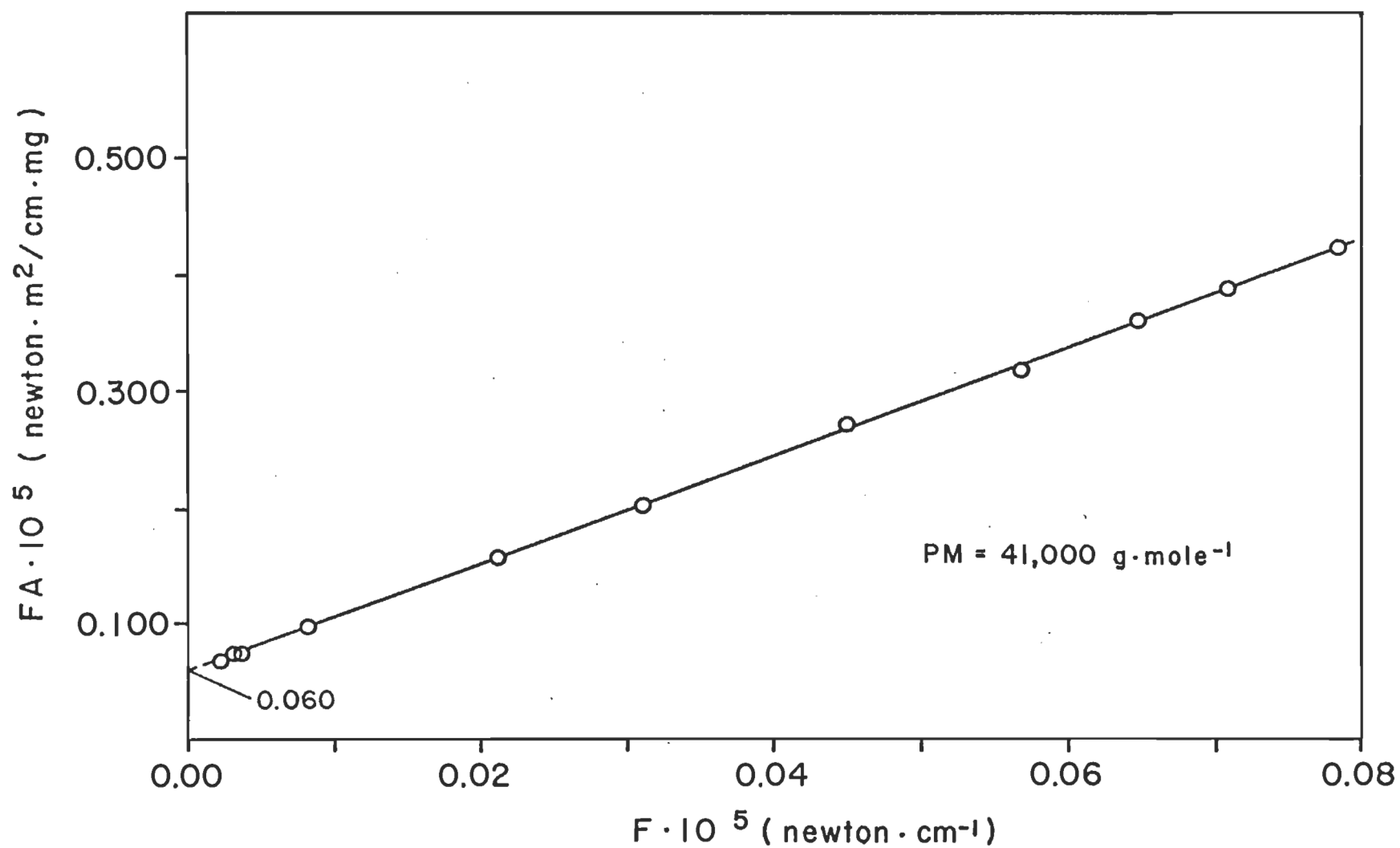
Poids moléculaire de l'ovalbumine. Comme pour le cas précédent l'ovalbumine n'a pas déçu. En effet, après plusieurs tests et en traçant la moyenne des courbes obtenues nous pouvons déterminer un P.M. de 41,000 (graphique #23). Si l'on compare à la valeur obtenue par la séquence des acides aminés qui est de 40,000 (voir tableau #10 p.159) nous pouvons confirmer la validité de nos résultats.

Voyons maintenant quelle sera la valeur du poids moléculaire pour une protéine plutôt instable et dont la controverse quant à son poids moléculaire est de pleine actualité.

Poids moléculaire de la rhodopsine de bovin. Si nous avons pensé déterminer le P.M. de la rhodopsine de bovin c'est justement dû aux résultats satisfaisants obtenus avec les différentes protéines. Il y a également le fait que cette protéine était, d'après nos données expérimentales, très pure donc très adéquate.



Graphique 22. Détermination du poids moléculaire du cytochrome c: système à faible pression de surface.



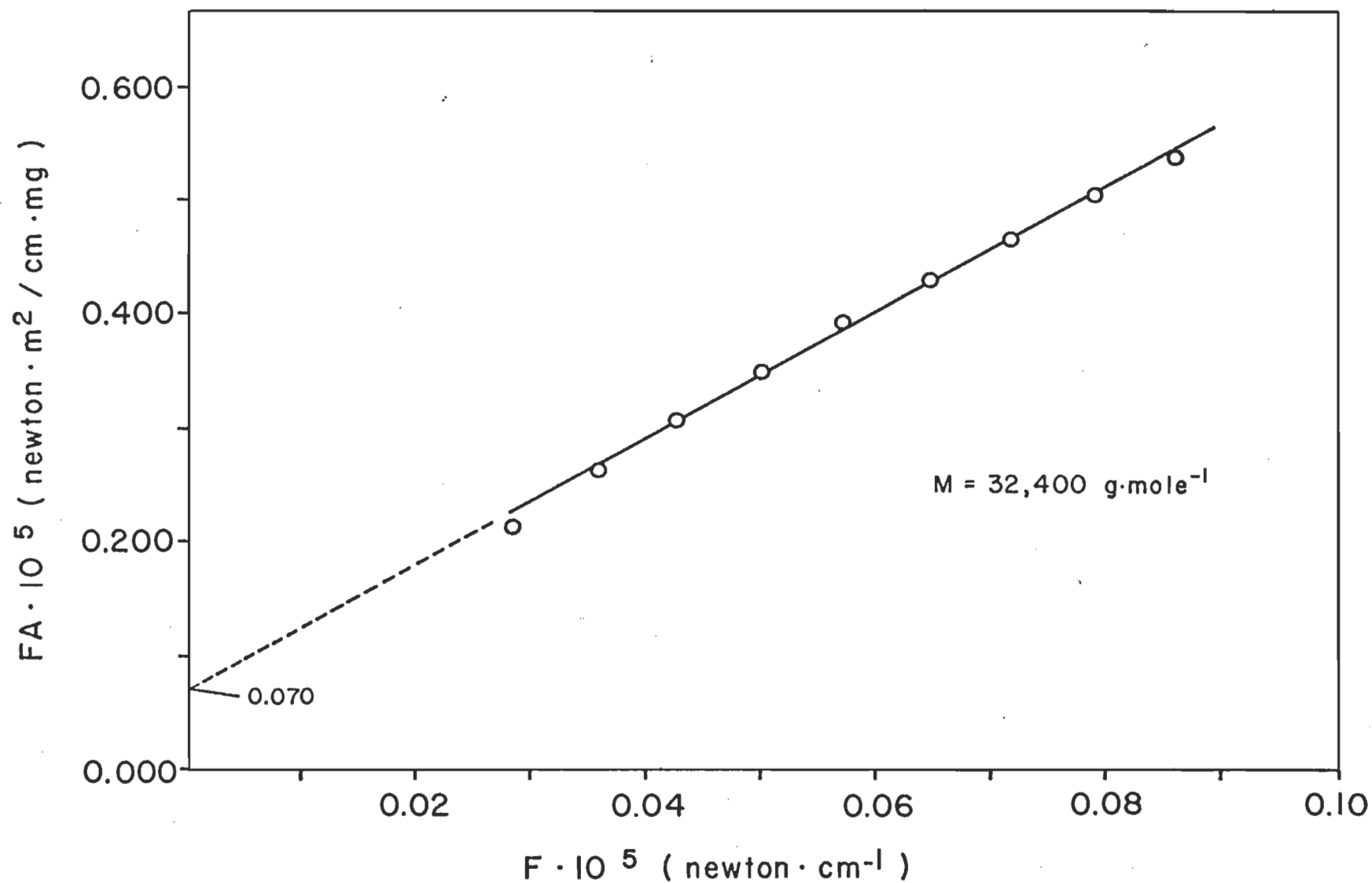
Graphique 23. Détermination du poids moléculaire de l'ovalbumine: système à faible pression de surface.

En appliquant la technique de faible pression de surface avec la rhodopsine nous obtenons un P.M. de 32,400 g/mole comme le démontre le graphique #24 qui représente la courbe moyenne des données expérimentales. Ces résultats ont d'ailleurs été publiés dans Vision Research par Kossi, C.N., Munger, G., et Leblanc, R.M. (1977).

Nous venons de franchir l'étape finale de notre travail. Cette dernière partie nous a démontré qu'il était possible de travailler à de très faibles pressions de surface et que nous pouvions également utiliser la caractéristique des films gazeux dans la détermination du poids moléculaire.

Sans plus tarder, voyons dans la discussion et la conclusion qui va suivre la comparaison de notre système avec d'autres méthodes et avec les systèmes utilisant comme nous les mêmes formules mais des principes d'appareillage différents pour les mesures de faible pression de surface.

Afin de faciliter cette comparaison, les tableaux #9 et #10 nous permettront une plus grande compréhension. Ces résultats représentent la détermination des poids moléculaires à faible pression de surface de l'albumine bovine, de la G actine et de l'ovalbumine puis le poids moléculaire des protéines étudiées selon différentes méthodes.



Graphique 24. Détermination du poids moléculaire de la rhodopsine: système à faible pression de surface.

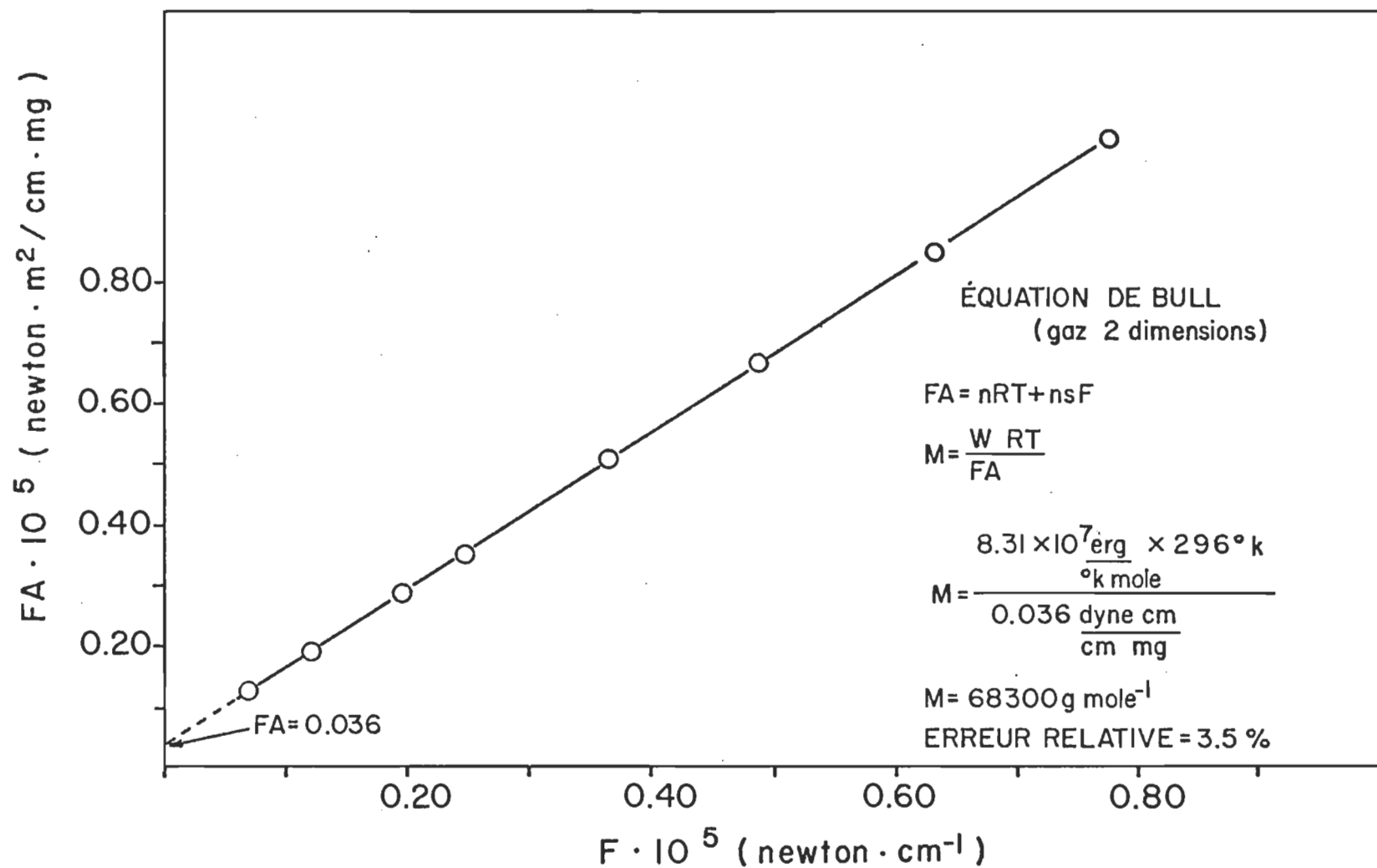
DISCUSSION SUR LA DETERMINATION DU POIDS
MOLECULAIRE DES PROTEINES A L'INTERFACE AIR/EAU

DISCUSSION SUR LA DETERMINATION DU POIDS
MOLECULAIRE DES PROTEINES A L'INTERFACE AIR/EAU

La qualité de nos expériences et de la bonne marche de notre travail a été facilitée par trois facteurs importants: premièrement la pureté des divers produits, deuxièmement la qualité des montages, en particulier celui à faible pression de surface, nous permettant de prendre des mesures à des pressions aussi faibles que 0.001×10^{-5} newton/cm (dyne/cm), et finalement la grande pureté de l'eau. Cette dernière fut traitée et retraitée de toutes les façons imaginables pour en arriver finalement à de très bons résultats en utilisant le système millipore puis la double distillation dans le système en quartz.

Si l'on compare les résultats obtenus pour l'albumine de bovin avec un système conventionnel et celui fonctionnant avec les fibres optiques à faible pression de surface, nous obtenons une erreur relative de 3.5% comparativement à 0.7% pour notre propre montage. Le graphique #25 montré à la page 153 nous donne la valeur du poids moléculaire (P.M.) obtenu à forte pression de surface. Pour l'albumine de bovin les résultats sont à peu près toujours semblables. Cependant, dépendant du manipulateur, des erreurs variant de 5 à 10% sont couramment obtenues à "forte" pression de surface i.e., prises entre 0.1 et 1×10^{-5} newton/cm (dyne/cm). On comprend donc aisément la nécessité d'un système plus adéquat pour des mesures plus exactes.

Le tableau #9 de la page 155 nous permet de constater la variation du P.M. pour l'albumine de bovin selon la sensibilité du système. Celui employé par Tvaroha, B. (1954) avait une sensibilité de 0.001×10^{-5} newton/cm (dyne/cm) et il n'a pu obtenir une précision supérieure à 3% sur la mesure du P.M.



Graphique 25. Détermination du poids moléculaire de l'albumine de bovin: système à forte pression de surface.

de l'albumine de bovin. Ce dernier a utilisé la méthode micromanométrique qui se veut précise au millidyne, mais nous croyons qu'il n'en est pas le cas. Selon nous les fluctuations apportées par le balancier, avec fil de torsion vertical, sont beaucoup trop grandes pour des mesures aussi précises.

Pour l'ovalbumine, le P.M. dépend de la sous-phase. Nous avons constaté qu'avec l'acétate de sodium nous obtenions un poids moléculaire de 41,000 donc une erreur relative de 2.3% avec celui de la composition en acide aminé (voir annexe p. 184). Plusieurs auteurs ont utilisé le sulfate d'ammonium et ont obtenu des P.M. de 45,000. Probablement que voyant la valeur de 40,000 obtenue par Guastalla, J. (1939b), sur une sous-phase d'acide chlorhydrique 0.01N, Bull, H.B. en 1945a,c a pensé qu'il se produisait une solubilisation. Mais depuis nous savons que due à sa forte hydrophobicité la protéine est très peu soluble à l'interface air/eau ce qui confirme la valeur obtenue par Guastalla, J. en 1939b.

Dernièrement le P.M. de la G actine fut déterminé en 1972 à faible pression de surface par Yegiazarova, A.R. et coll. mais la méthode de purification de la protéine n'était pas très bonne. Ces derniers obtinrent un P.M. de 58,100 comparativement à la valeur de 42,300 obtenue par le poids des acides aminés composant la protéine correspondant à une erreur relative de 27.1%. Dans notre cas, nous obtenons une erreur relative de 12.8% pour un P.M. de 37,500. En conclusion, sur la G actine, nous pouvons affirmer que notre système et surtout notre préparation nous ont permis d'obtenir une valeur plus précise. Le P.M. de la G actine dépend de certains facteurs comme: la concentration d'ATP, de phalloïdine, de KCl et le pH qui devront être examinés dans une étude future.

Tableau 9. Détermination du poids moléculaire à faible pression de surface selon différents auteurs.

Protéine	Sous-phase	Solvant	Surface m^2/mg (à 5×10^{-5} newton/cm)	Sensibilité 10^{-5} newton/cm V	Poids moléculaire g/mole	Référence
Albumine de bovin	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5% pH: 5.0 25°C	H_2O	1.2	0.1	70,000	Bull, H.B. (1950)
Albumine de bovin	H_2SO_4 0.1 M	NaCl 0.15 M isopropanol 0.01%		0.001	68,000	Tvaroha, B. (1954)
Albumine de bovin	H_2SO_4 0.01 M	"		0.001	68,000	Tvaroha, B. (1954)
Albumine de bovin	H_2O	H_2O	0.89	0.01	65,000	Muramatsu, M. & Sobotka, H. (1962)
	NaCl ou KCl 0.5 M pH: 5.0 $\pm 0.01^\circ\text{C}$	NaCl ou KCl 0.5 M pH: 5.0	0.89	0.01	68,000	
Albumine de bovin	Tampon tris 0.1 mM pH: 5.8 22°C	H_2O pH: 5.0-5.2	0.89	0.001	66,480	Munger, G. (présent travail)
G actine	KCl 0.1M	MgCl_2 1 mM ATP 0.5 M	0.54	0.01	58,100	Yegiazarova, A.R. & Zaalishvili, M.M. (1972)
G actine		KCl 0.1 M H_3PO_4 0.025 M pH: 7.0	0.51	0.01	110,000	Yegiazarova, A.R. & Zaalishvili, M.M. (1972)

Protéine	Sous-phase	Solvant	Surface m ² /mg (à 5x10 ⁻⁵ newton/cm)	Sensibilité 10 ⁻⁵ newton/cm V	Poids moléculaire g/mole	Référence
G-actine	ATP 0.2 mM CaCl ₂ 1 mM Tampon tris HCl 25 mM pH: 6.0 23°C	ATP 0.5 mM CaCl ₂ 1 mM KCl 0.1 M Tampon tris HCl 25 mM pH: 6.0 23°C	0.54	0.001	37,500 82,000	Munger, G. (présent travail)
Cytochrome <u>c</u>	Tampon carbonate 1 mM pH: 10.0 23.5°C	Tampon carbonate 1 mM pH: 10.0 23.5°C	0.86	0.001	12,600	Munger, G. (présent travail)
Ovalbumine	HCl 0.01 N			0.001	40,000	Guastalla, J. (1939)
Ovalbumine	(NH ₄) ₂ SO ₄ 35%		0.82	0.1	44,000	Bull, H.B. (1945)
Ovalbumine	(NH ₄) ₂ SO ₄ 5% pH: 3.60		1.05	0.1	45,000	Bull, H.B. (1950)
Ovalbumine	(NH ₄) ₂ SO ₄ 5% pH: 5.00		1.02	0.1	45,000	Bull, H.B. (1950)
Ovalbumine	(NH ₄) ₂ SO ₄ 5% pH: 11.95		1.18	0.1	45,000	Bull, H.B. (1950)
Ovalbumine	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1% pH: 2.3		2.15	0.1	45,000	Bull, H.B. (1950)
Ovalbumine	MgSO ₄ 5%		0.89	0.1	45,000	Bull, H.B. (1950)

Protéine	Sous-phase	Solvant	Surface m^2/mg ($\text{\AA} \times 10^{-5}$ newton/cm)	Sensibilité 10^{-5} newton/cm V	Poids moléculaire g/mole	Référence
Ovalbumine	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.6 M pH: 5.5		1.16	0.001	44,900	Mishuck, E., & Eirich, F. (1954)
Ovalbumine	Acétate de sodium 0.5 mM 23°C	H_2O pH: 5.5 23°C	0.92	0.001	41,000	Munger, G. (présent travail)
Rhodopsine	Tampon tris HCl 0.2 mM pH: 5.8 23°C	Tampon tris HCl 0.2 mM Triton X-100 0.05% pH: 5.8 23°C	$2.85 \times 10^{-3} \text{ \AA}^2/\text{molécule}$	0.001	32,400	Koss1, C.N., Munger, G., & Leblanc R.M. (1977)

Pour ce qui est du cytochrome c, il n'y a pas eu dans le passé, de détermination par faible pression de surface du P.M.. Toutefois si l'on compare nos résultats à ceux de la littérature, obtenue par d'autres méthodes, nous constatons que la précision est comparable. Le P.M. déterminé est de 12,600 soit une erreur relative de 2.0% sur la valeur de 12,400 selon Wainio, W.W. (1971) (voir tableau #10 p.159). Encore là, nous constatons l'efficacité de notre montage basé sur le principe de fibres optiques et de phototransistors.

La dernière protéine étudiée fut la rhodopsine qui est très controversée en ce qui concerne son P.M.. Il varie de 26,000 à 40,000 suivant les techniques expérimentales et la purification comme le démontrent les résultats du tableau #10 à la page 159. En ce qui nous concerne, un P.M. moyen de 32,400 g/mole serait une valeur réaliste. Plusieurs éléments confirment ce résultat puisque notre pureté est excellente et que nous travaillons avec un système idéal i.e., qu'il démontre une très grande sensibilité et une détermination très exacte pour différentes protéines, donc il devrait en être de même pour la rhodopsine pure. Un seul élément peut faire varier sensiblement le P.M. et c'est le Triton X-100 contenu à 0.05% en solution avec notre protéine. Cependant nous ne croyons pas que le Triton X-100 influence à plus que 2 - 3% la valeur du P.M. Ce dernier peut faire varier le P.M. en favorisant une solubilisation partielle de la rhodopsine dans la sous-phase. En regardant les résultats obtenus pour la courbe de pression de surface, à la page 124, et en comparaison avec le nombre d'acides aminés (273, voir annexe p.185) il est normal d'obtenir une surface d'environ $0.6 \text{ m}^2/\text{mg}$ à 5×10^{-5} newton/cm (dyne/cm). Un résultat de ce genre nous

Tableau 10. Poids moléculaires obtenus selon différentes méthodes.

Protéine	Méthode	Poids moléculaire	Référence
Albumine de bovin	Ultracentrifugation	67,500	Svedberg, T. et Sjoegren, B. (1928)
	Acides aminés	66,100	Edsall, J.T. (1946)
	Pression osmotique	69,000	Scatchard, G., Balchelder, A.C. et Brown, A. (1944)
	Diffusion	65,360	Greeth, J.M. (1952)
	Sédimentation à l'équilibre	65,360	Greeth, J.M. (1952)
	Rayon-X	65,000	Low, B.W. (1952)
	Pression de surface avec balance verticale	68,000	Tvaroha, B. (1954)
	Chromatographie sur Sephadex G-100 et G-200	65,000	Morris, C.J.O.R. (1964)
	Coefficient de sédimentation	65,000	Davidson, B.E. et Hird, F.J.R. (1967)
	Viscosité intrinsèque	68,000	Tanford, C., Kawahara, K. et Lapranje S. (1967)
	Pression de surface avec micromanomètre	66,590	Christodoulou, A.P. (1968)
	Chromatographie sur Sephadex G-100	66,700	Squire, P.G., Moser, P. et O'Konski, C.T. (1968)
	Gel de polyacrylamide	68,000	Weber, K. et Osborn, M. (1969)
	Gel de polyacrylamide en présence de SDS	69,000	Fish, W.W. (1975)

Protéine	Méthode	Poids moléculaire	Référence
Albumine de bovin	Faible pression de surface (fibres optiques)	66,480	Munger, G. (présent travail)
Cytochrome <u>c</u>	Chromatographie sur Sephadex G-100 et G-200	13,000	Morris, C.J.O.R. (1964)
	Gel de polyacrilamide	11,700	Weber, K. et coll. (1969)
	Acides aminés	12,400	Wainio, W.W. (1971)
	Constante d'équilibre	14,000	
	Faible pression de surface (fibres optiques)	12,600	Munger, G. (présent travail)
<u>G</u> actine	Pression de surface avec balance verticale	52,000	Egiazarova, A.R. et Nadareishvili, K. Sh. (1973)
	Acides aminés	41,785	Elzinga, M., Collins, J.H., Kuehl, W.M. et Adelstein, R.S. (1973)
	Faible pression de surface (fibres optiques)	37,500 82,000	Munger, G. (présent travail)
Ovalbumine	Electrodyalise	34,500	Svedberg, T. et Nichols, J.R. (1926-1927)
	Ultracentrifugation	40,500	Svedberg, T. (1937)
	Acides aminés	40,000	Greenberg, D.M. (1951)
	Chromatographie sur Sephadex G-100 et G-200	45,000	Morris, C.J.O.R. (1964)

Protéine	Méthode	Poids moléculaire	Référence
Ovalbumine	Osmométrie	43,000	Castellino, F.J. et Barker, R. (1968)
	Acides aminés	40,000	Dayhoff, M.O. et Eck, R.V. (1967-1968)
	Gel de polyacrilamide	43,000	Weber, K. et coll. (1969)
	Gel de polyacrilamide en présence de SDS	43,500	Fish, W.W. et coll. (1969)
	Faible pression de surface (fibres optiques)	41,000	Munger, G. (présent travail)
Rhodopsine de bovin	Centrifugation	40,000	Hubbard, R. (1954)
	Purifié sur Sephadex G-25	28,600	Shields, J.E., Dinovo, E.C., Henriksen, R.A., Kimbel, R.L., Jr. et Millar, P.G. (1967)
	Purifié sur Sephadex et agarose	27,000-30,000	Heller, J. (1968)
	Electrophorèse	35,000	Cavanagh, H.E. et Wald, G. (1969)
	Purifié par filtration sur gel, électrophorèse sur gel d'acrilamide, délipidation enzymatique	40,000	Deamen, F.J.M., De Grip, W.J. et Jansen, P.A.A. (1972)
	Purifié au Triton X-100 par ultracentrifugation	35,000	Lewis, M.S., Krieg, L.C. et Kirk, W.D. (1974)
	Faible pression de surface (fibres optiques)	32,400	Munger, G. (présent travail)

porte à croire cependant qu'une partie de la protéine se retrouve en solution sauf si elle est très compressible. Donc il faudra élaborer notre travail du côté de la sous-phase i.e., en augmentant la concentration de sel ou en se rapprochant du point isoélectrique pour conclure avec certitude.

L'une des analyses les plus intéressantes, suite aux résultats que nous avons obtenus, serait pour chaque protéine, de tracer les courbes théoriques de FA en fonction de F selon l'équation de Singer, S.J. (1948). Cette dernière peut être formulée de la façon suivante:

$$F = - \frac{KT}{a_L} \left[\ln \left(1 - \frac{a_L}{A} \right) - \left(\frac{x-1}{x} \right) \times \frac{z}{2} \ln \left(1 - \frac{z}{2} \frac{a_L}{A} \right) \right]$$

(voir introduction p. 13)

F: pression du film

A: surface à la pression indiquée

K: constante de Boltzmann

T: température absolue

x: le degré de polymérisation pour un polymère et dans le cas d'une protéine le nombre de résidus d'acides aminés dans la molécule

a_L : surface occupée par chaque molécule compressée

z: nombre de coordination ou nombre de positions pouvant être occupées par un segment du peptide en relation avec un segment adjacent.

Donc si l'on attribue des valeurs constantes à z et a_L , nous trouverons alors pour chaque A un F correspondant.

Etant donné que le but premier n'est pas la comparaison entre la méthode expérimentale et théorique, nous avons donc choisi d'analyser les courbes de l'ovalbumine obtenues selon différentes méthodes expérimentales par rapport à l'équation de Singer.

L'interprétation de notre courbe expérimentale pour l'ovalbumine, à faible pression de surface, comparativement aux résultats de Guastalla, J. (1939b), Bull, H.B. (1945a) et Singer, S.J. (1948) nous est donnée dans le tableau #11.

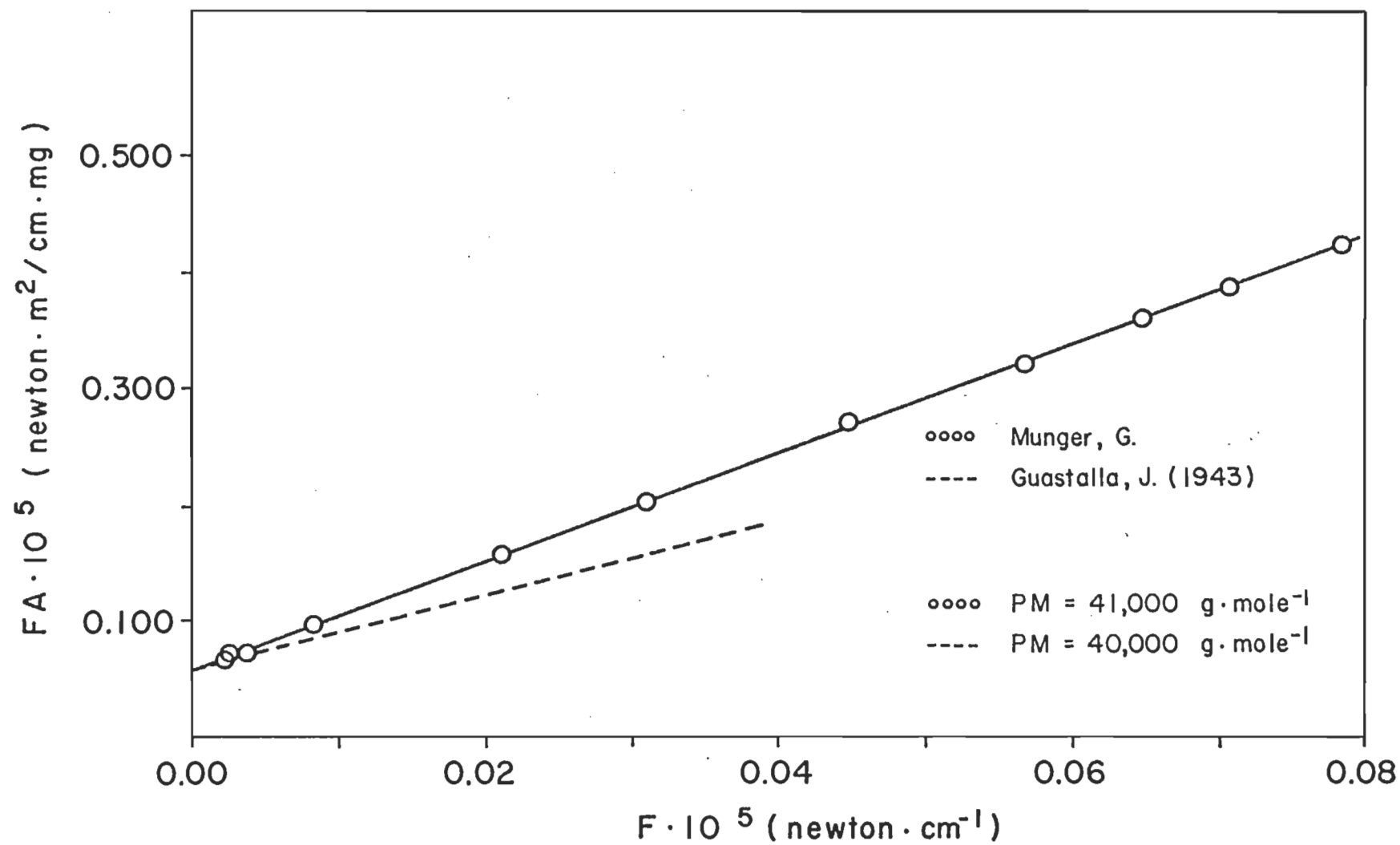
TABLEAU 11

Détermination du poids moléculaire de l'ovalbumine à l'interface air/eau expérimentalement et théoriquement.

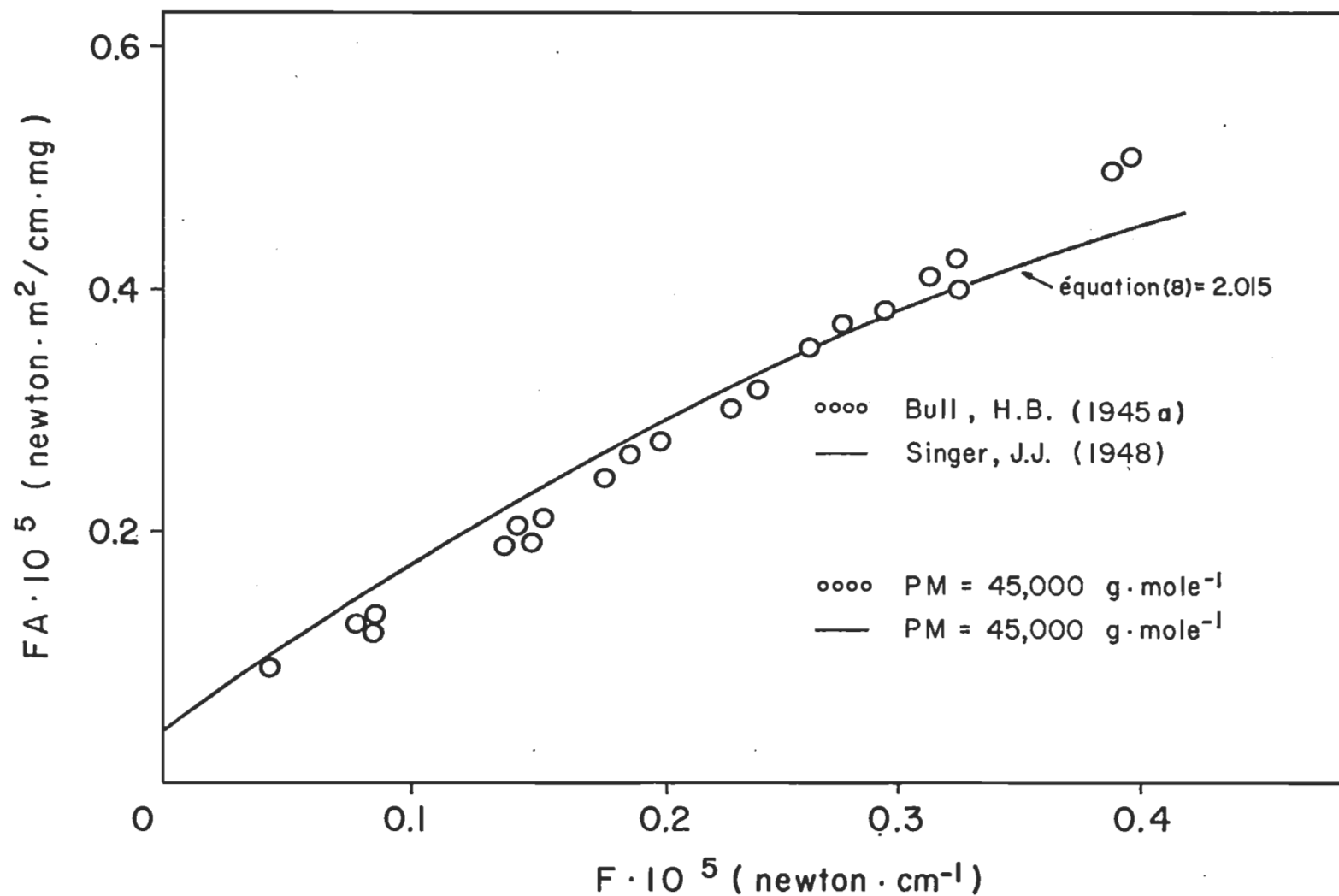
Système de détection	Précision ($\times 10^{-5}$ newton/cm)	Sous-phase	Poids moléculaire	Références
Micromanomètre	0.001	HCl - 0.01N	40,000	Guastalla, J. (1939b)
Plaque de Wilhelmy	0.005	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 35%	45,000	Bull, H.B. (1945a)
Théorique: $z = 2.015$	-----	-----	45,000	Singer, S.J. (1948)
Capteur de déplacement (phototransistor)	0.0005	Acétate de Na 0.005N	41,000	Munger, G. (présent travail)

Ces données sont extraites des graphiques #26, p. 164, et #27, p. 165. Si l'on compare les résultats de chacun de ces graphiques il y a tout d'abord une très grande différence dans l'échelle des mesures, soit de 0.001 à 0.100×10^{-5} newton/cm (dyne/cm) par rapport à 0.05 à 0.40×10^{-5} newton/cm (dyne/cm).

Les valeurs de P.M. sont d'ailleurs un reflet de cette précision puisqu'il y a une erreur relative de 10% selon Bull, H.B. et Singer, S.J. comparativement à 2.5% dans notre cas et 0% pour Guastalla, J. (1939b)



Graphique 26. Courbe de FA en fonction de F pour l'ovalbumine à l'interface air/eau selon Guastalla, J. (1943) et Munger, G. (présent travail).



Graphique 26. Courbe de FA en fonction de F pour l'ovalbumine à l'interface air/eau selon Bull, H.B. (1945a) et l'équation de Singer, J.J. (1948).

dont la courbe expérimentale du graphique #26 a été obtenue par une transformation de sa courbe de pression F tracée en fonction de la concentration (F en millidyne/cm et c en milligramme/m²). Toutefois, selon l'équation de Singer il n'est pas exact de donner une précision sur un graphique puisqu'il s'agit de valeurs théoriques qui dépendent des valeurs de z et de a_L choisies.

Il est donc possible de déterminer un P.M. avec précision si la méthode de mesure est très sensible à faible pression de surface et si l'on travaille sous des conditions précises. De plus, il est important de signaler que les valeurs expérimentales peuvent être comparées efficacement avec celles théoriques si l'on choisit adéquatement les données expérimentales: pourcentage de flexibilité donc nombre de coordination, surface occupée par chaque molécule compressée et le nombre d'acides aminés.

Pour certaines protéines que l'on a expérimenté soit: l'albumine de bovin, l'ovalbumine et le cytochrome c, il aurait été intéressant de retirer le film de la surface et de prendre un spectre de la rotation optique. Nous aurions pu en tirer des informations sur l'état de la protéine i.e., si elle se dénature à l'interface air/eau, par le changement de l'angle de rotation. Comme l'appareillage pour exécuter un tel travail n'est pas disponible, nous envisageons donc de construire une cellule spéciale et d'appliquer le principe dans un avenir prochain.

CONCLUSION

CONCLUSION

Suite à cette discussion il est intéressant de constater, face aux autres méthodes de détermination des poids moléculaires, que nous avons, grâce à notre méthode optique, obtenu des résultats concrets. Le tout se confirme davantage lorsque l'on compare nos données avec la littérature et que l'on en arrive à des erreurs relatives inférieures à 5%, sauf pour la G actine qui est vraiment une protéine qui demande une plus longue étude sous différentes conditions: concentration d'ATP, de phalloïdine, de KCl et bien entendu de pH.

Maintenant que nous avons passé l'étape principale, c'est-à-dire de standardisation nous pouvons maintenant envisager d'autres débouchés pour un tel système. De ce fait, le but principal qui vient se greffer à ce stade de notre travail est l'étude de l'énergie d'interaction de différents constituants de la membrane interne du chloroplaste. Il est maintenant possible que des projets de recherche intéressants se concrétisent dans ce domaine et ainsi poursuivre le travail dans le but de nous permettre d'approfondir les connaissances de notre milieu de vie.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Adamson, A.W. Physical chemistry of surfaces (2nd edition). New-York Interscience Publ. 1967, 747.
- Alexander, A.E. Builts up films of unsaturated and substituted long-chain components. J. Amer. Chem. Soc. 1939, 7, 777-781.
- Alexander, A.E., Teorell, T., & Aborg, C.G. Study of films at the liquid/liquid interface III. Specific effect of calcium ions on cephalin monolayers. Trans. Faraday Society. 1939, 35, 1200-1205.
- Anderson, P.A., & Evett, A.A. Automatic recording of the pressure-area, pressure-time, and area-time characteristics of monomolecular films. Rev. Sc. Instr. 1952, 23(9), 485-488.
- Anderson, K.J.I., Stenhagen, S.S., & Stenhagen, E. A recording balance of the wilhelmy-Dervichian type. The svedberg (mem. vol.). 1944, 11-32.
- Azuma, K., & Kagaki, M. Rhodopsin film at air-water interface. Ann. Rep. Biol. Works. 1966, 14, 73-81.
- Birdi, K.S. The determination of work of compression of protein monolayers at the air-water interface. Kolloid - Z.u.Z. polymere. 1972, 250, 222-226.
- Birdi, K.S. Spread monolayers films of proteins at the air-water interface. J. Coll. Int. Sci. 1973, 43, 545-547.
- Blank, M. Intermolecular interactions in newly spread serum albumin monolayers. J. Coll. Int. Sci. 1969, 29, 205-209.
- Blank, M., Lucassen, J., & Van Den Tempel, M. Elasticities of spread monolayers of bovine serum albumin and ovalbumin. J. Coll. Int. Sci. 1970, 33(1), 94-100.
- Blodgett, K.B., & Langmuir, I. Built-up films of Ba stearate and their optical properties. Phys. Rev. 1937, 51, 964-982.
- Bowness, J.M. Purification of rhodopsin using columns containing calcium triphosphate. Biochim. Biophys. Acta. 1959, 31, 305-310.
- Bull, H.B., & Neurath, H. The denaturation of egg albumin. II. Surface denaturation of egg albumin. J. Biol. Chem. 1937, 118, 163-175.

- Bull, H.B. Studies on surface denaturation of egg albumin. J. Biol. Chem. 1938, 125, 585-598.
- Bull, H.B. Monolayers of egg albumin on concentrated salt solutions. J. Am. Chem. Soc. 1945, 67, 4-8. (a)
- Bull, H.B. Monolayers of β -lactoglobulin on concentrated salt solutions. J. Amer. Chem. Soc. 1945, 67, 8-10. (b)
- Bull, H.B. Mixed monolayers of egg albumin and lauryl sulfate. J. Amer. Chem. Soc. 1945, 67, 10-12. (c)
- Bull, H.B. Mixed monolayers of β -lactoglobulin II. Film molecular weight. J. Amer. Chem. Soc. 1946, 68, 745-747.
- Bull, H.B. Spread monolayers of protein. Adv. Prot. Chem. 1947, III, 95-121.
- Bull, H.B. Determination of molecular weight of protein in spread monolayers. J. Biol. Chem. 1950, 185, 27-38.
- Bull, H.B. Adsorbed surface films of egg albumin. J. Coll. Int. Sci. 1972, 41(2), 305-310.
- Cadenhead, D.A., & Osonka, J.E. The influence of ethanol on both condensed and expanded monomolecular films at the air-water interface. J. Coll. Int. Sci. 1970, 33(1), 188-191.
- Castellino, F.J., & Barker, R. Examination of the dissociation of multichain proteins in guanidine hydrochloride by membrane osmometry. Biochemistry. 1968, 7(6), 2207-2217.
- Casilla, R., Cooper, W.D., & Eley., D.D. Temperature effect on stearic acid monolayers on water. J. Chem. Soc. 1973, 69, 257-262.
- Cavanagh, H.E., & Wald, G. Purification and partial characterization of bovine visual pigment protein. Fedn. Proc., Fedn. Am. Socs. Exp. Biol. 1969, 28, 344.
- Cheesman, D.F., & Davis, J.T. Physicochemical and biological aspects of proteins at interfaces. Adv. Prot. Chem. 1954, IX, 439-501.
- Christodoulou, A.P. Ionization and the specific cation effect in long chain fatty acid monolayers. Ph.D. thesis. The university of New-York. 1968, 208.

- Davidson, B.E., & Hird, F.J.R. The reactivity of the disulfide bonds of purified proteins in relation to primary structure. Biochem. J. 1967, 104, 473-479.
- Davies, J.T. Factors influencing the orientation ϵ - amino groups in monolayers of proteins and amino-acid polymers. Biochem. J. 1954, 56, 509-513.
- Davies, J.T., & Rideal, E.K. Interfacial phenomena (2nd edition). New-York: Academic Press. 1963, 480.
- Day, R.A., Jr., & Underwood, A.L. Quantitative analysis (2nd edition) New-Jersey: Prentice-Hall, Inc. 2nd edition, Englewood Cliffs. 1967, 482.
- Dayhoff, M.O., & Eck, R.V. Atlas of protein sequence and structure. Maryland: National Biomedical Research Foundation, Silver Spring. 1967-1968.
- Deamen, F.J.M., De Grip, W.J., & Jansen, P.A.A. Biochemical aspects of the visual process. XX. Molecular weight of rhodopsin. Biochim. Biophys. Acta. 1972, 271(2), 419-428.
- Dervichian, D.G. Changes of phase and transformation of higher order in monolayers. J. Chem. Phys. 1939, 7, 931-948.
- Dixon, H.B.F., & Thompson, C.M. Chromatography of oxidized and reduced cytochrome c on carboxymethylcellulose. Bioch. J. 1968, 107, 427-431.
- Edsall, J.T. Correlations between physicochemical data and the amino acid composition of simple proteins. Ann. N.-Y. acad. Sci. 1946, 47, 229-236.
- Egiazarova, A.R., & Nadareishvili, K.Sh. Investigation of the influence of X irradiation of globular actin on the properties of its monolayers. UDS 577.391: 547.96. 1973, 508-512.
- Eisen, M.J. Interferometry in proteins. Sperimental. 1937, 91, 525-538.
- Elrey, T.G. The use of Ammonyx LO in the purification of rhodopsin and rod outer segments. Vision Research. 1971, 11, 1007-1009.
- Elzinga, M., Collins, J.H., Kuehl, W.M., & Adelstein, R.S. Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle. Proc. Nat. Acad. Sci. 1973, 70(9), 2687-2691.

- Erecinska, M. Cytochrome c interaction with membranes. V. Formylated cytochrome c. Arch. Biochem. Biophys. 1975, 169(1), 199-208.
- Evans, M.T.A., Mitchell, J., Mussellwhite, P.R., & Irons, L. The effect of the modification of protein structure on the properties of proteins spread and adsorbed at the air-water interface. Adv. Exp. Med. Biol. 1970, 7, 1-22.
- Fish, W.W. Determination of the molecular weights of membrane proteins and polypeptides. Methods in membrane biology. 1975, 4, 189-276.
- Fisher Corporation. Surface tensiometer model 20. 1972, Catalog 72C.
- Fourth, L. Lateral cohesion in protein monolayers. J. Phys. Chem. 1939, 43, 887-899.
- Fourth, L., Schmitt, F.O. Unimolecular films of nerve proteins. J. Phys. Chem. 1936, 40, 989.
- Froines, J.R. Investigations of internal return in select small ring compounds. (Yale University, 1967). Dissertation Abstracts B, 1967, 28(3), 837-838. (University Microfilms No. 67, 10, 707, 150).
- Fromherz, P. Instrumentation for handling monomolecular films at an air-water interface. Rev. Sci. Instr. 1975, 46(10), 1380-1385.
- Frommer, M.A., & Miller, I.R. Simple fully automatic recording surface balance. Rev. Sci. Instr. 1965, 36(5), 707-708.
- Gaines, G.L., Jr. The design and operation of an automatic recording film balance. General Electric Research Labor. 1963, report #63-RL - 3206 C. 1-15.
- Gaines, G.L., Jr. Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces. New-York: Interscience Publishers. 1966, 386.
- Gaines, G.L., Jr. Monolayers of some biologically important quinones. J. Coll. Int. Sci. 1968, 28(2), 334-336.
- Gershfeld, N.L., Pagano, R.E., Friauff, W.S., & Fuhrer, J. Millidyne sensor for the Langmuir film balance. Rev. Sci. Instr. 1970, 41, 1356-1358.
- Goldfinger, G. Clean surfaces: their preparation and characterization for interfacial studies. New-York: Marcel Dekker Ed., Inc. 1970, 385.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., & David, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. 1948, 177, 751-766.

- Grandmont, L.A., & Gruda, J. Affinity chromatography of myosin, heavy mero-myosin subfragment-one on F-actin column stabilized by phalloidin. Can. J. Biochem. (sous presse)
- Greenberg, D.M. Amino acids and proteins. Springfield: Greenberg, D.M. C.C. Thomas Pub. 1951, 960.
- Gruda, J. Purification de la G actin. Cahier de laboratoire. 1972, non publié.
- Guastalla, J. Measurement of very small surface pressures. Compt. Rend. Acad. Sci. 1938, 206, 993-995.
- Guastalla, J. Surface balance with a pendulous suspension. Compt. Rend. Acad. Sci. 1939, 208, 973-975. (a)
- Guastalla, J. Very thin films of some proteins their molecular masses. Compt. Rend. Acad. Sci. 1939, 208, 1078-1080. (b)
- Harkins, W.D. Electrical relations of surfaces, the spreading of liquids, the thickness of surface films and the drop-weight and ring methods for the determination of surface tension. Colloid Symposium Monograph. 1928, 6, 17-40.
- Harkins, W.D. Surface structure and atome building. Science. 1929, 70, 433-442, 463-470. The Willard Gibbsy Lecture 1929.
- Harkins, W.D. Oriented molecules at the solid liquid interface and the non-specific nature of ordinary adsorption. Phys. Rev. 1932, 39, 190.
- Harkins, W.D., & Anderson, T.F. A simple accurate film balance of the vertical type for biological and chemical work and experimental comparison with the horizontal type. J. Am. Chem. Soc. 1937, 59, 2189-2197.
- Harkins, W.D., & Anderson, T.F. Protein monolayers - films of oxidized cytochrome c. J. Biol. Chem. 1938, 125, 369-376.
- Harkins, W.D., & Myers, R.J. Multimolecular films. J. Amer. Chem. Soc. 1936, 58, 1817-1819.
- Heller, J. Structure of visual pigment. I: Purification, molecular weight and composition of bovine visual pigment₅₀₀. Biochemistry. 1968, 7, 2903-2913.
- Hubbard, R. The molecular weight of rhodopsin and the nature of the rhodopsin-digitonin complex. J. Gen. Physiol. 1954, 37, 381-399.

- Huggins, M.L. Some properties of long-chain compounds. J. Phys. Chem. 1942, 46, 151-158.
- Jenkins, G.I., & Norris, A. Thickness of built-up films. Nature. 1939, 144, 441.
- Joos, P. Constitution of spread and adsorbed monolayers of proteins. Vla. Acad. Wet., Kla. Wetens. Mede. 1968, 30(3), 3-23.
- Jost, W. Diffusion in solids, liquids and gases. Third printing with addendum. New-York: Academic Press. 1960, 558.
- Jungblut, P.W., & Turba, F. Comparison of performance of methods for rat serum albumin and characterization of a pure preparation. Bioch. Z. 1963, 337, 88-103.
- Kashiwagi, M. Dynamic studies on monolayer. II Surface films of physically and chemically treated ovalbumin. J. Chem. Soc. Japan. 1959, 31, 954-956.
- Korzheniouskii, G.A. Structure of surface layers. J. Phys. Chem. 1935, 6, 954-965.
- Kossi, C.N. Propriétés physico-chimiques d'extraits purifiés de rhodopsine à l'état de monocouche. Thèse de maîtrise. UQTR. 1976, 108.
- Kossi, C.N., Munger, G., & Leblanc, R.M. Molecular weight of bovine rhodopsin as determined by the monolayer method. Vision Research. 1977, 17, 917-918.
- Langmuir, I. The mechanism of the surface phenomena of flotation. Trans. Farad. Soc. 1920, 15, 62.
- Langmuir, I. Molecular layers. Proc. Roy. Soc. London. 1939, A-170 (940), 390-425.
- Langmuir, I., & Schaeffer, V.J. The effect of dissolved salts on insoluble monolayers. J. Amer. Chem. Soc. 1937, 59, 2400-2414.
- Langmuir, I., Schaeffer, V.J., & Sobotka, H. Multilayers of sterols and the adsorption of digitonin by deposited monolayers. J. Amer. Chem. Soc. 1937, 59, 1751-1759.
- Langmuir, I., & Waugh, D.F. Pressure-soluble and pressure displaceable components of monolayers of native and denatured proteins. J. Amer. Chem. Soc. 1940, 62, 2771-2793.

- Leblanc, R.M., & Orger, B. An evaluation of monolayer techniques in this laboratory, using a Langmuir type surface pressure balance. Research Report. 1970, unpublished.
- Lewis, M.S., Krieg, L.C., & Kirk, W.D. Molecular weight and detergent binding of bovine rhodopsin. Exp. Eye Res. 1974, 18, 29-40.
- Long, C. Biochemists' handbook (2nd edition by Long, C.) E. and F.N. Spon Ltd. 1968, 1192.
- Low, B.W. Preparation and properties of serum and plasma proteins. XXXIV. An X-ray study of crystalline human serum albumin preparations. J. Am. Chem. Soc. 1952, 74, 4830-4834.
- MacRitchie, F. Collapse of protein monolayers. J. Coll. Sci. 1963, 18, 555-561.
- MacRitchie, F. The adsorption of proteins at the solid-liquid interface. J. Coll. Int. Sci. 1972, 38(2), 484-488.
- Malcolm, B.R. The structure and properties of monolayers of synthetic polypeptides at the air-water interface. Prog. Surf. Membr. Sci. 1973, 7, 183-229.
- Malcolm, B.R. Hydrophobic side chain interactions in synthetic polypeptides and proteins at the air-water interface. Adv. Chem. Ser. 1975, 145, 338-359.
- Mann, J.A., Jr., & Hansen, R.S. A simple technique for the automatic recording of monolayer compression characteristics. Rev. Sc. Instr. 1960, 31(9), 961-963.
- Mann, J.A., Jr., & Hansen, R.S. Automatic recording surface balance II. Rev. Sc. Instr. 1963, 34, 702-703.
- Margoliash, E., & Schejter, A. Cytochrome c. Adv. Prot. Chem. 1966, 21, 113-286.
- Margoliash, E., Kimmel, J.R., Hill, R.L., & Schmidt, W.D. Amino acid composition of horse heart cytochrome c. J. Biol. Chem. 1962, 237, 2151-2160.
- Matthews, J.B. Influence of certain carbohydrate substances upon the interfacial tension between water and cyclohexane. Trans. Farad. Soc. 1939, 35, 1113-1122.
- Mishuck, E., & Eirich, F. The determination of molecular weights of protein by the horizontal surface balance. AAAS Symp. 1954, 14-32.

- Mitchell, J.S. The structure of protein monolayers. Trans. Farad. Soc. 1937, 33, 1129-1135.
- Morris, C.J.O.R. Thin layer chromatography of proteins on sephadex G-100 and G-200. J. Chromatog. 1964, 16, 167-175.
- Motomura, K. Theoretical consideration of the low pressure region of protein monolayers. J. Coll. Int. Sci. 1964, 19, 425-432.
- Muramatsu, M. Interaction of surface films with solute in solution. I. potentiometric titration of aqueous dye solution and calculation of ionization constant of dye, II. sorption of dye on the built up film of stearic acid and Ba stearate, III. effect of dissolved dyes on the monolayer of octadecylamine. Bull. Chem. Soc. Japon. 1958, 31, 864-871.
- Muramatsu, M. Interaction of surface films with solute in solution; IV. Effect of Congo red dissolved in aqueous substrate on the monolayers of octadecylamine; hepadecyl alcohol, Et n-hexadecyl ether, Et stearate, and cholesterol. Bull. Chem. Soc. Japon. 1959, 32, 114-119.
- Muramatsu, M. V. Deposition of monolayers of several amphipathic compound from surfaces of aqueous solutions of Congo red and crystal violet. Bull. Chem. Soc. Japon. 1959, 32, 391-395.
- Muramatsu, M., & Sobotka, H. Molecular weight, limiting area, and flexibility of unimolecular layers of serum albumine bovine and its derived. J. Phys. Chem. 1962, 66, 1918-1923.
- Muramatsu, M., & Sobotka, H. Studies on unimolecular layers of modified proteins I. Bovine serum albumin and its acetyl derivatives. J. Coll. Sci. 1963, 18(7), 625-635.
- Musselwhite, P.R., & Palmer, J. The thickness of adsorbed films of bovine serum albumin at the air-water interface. J. Coll. Inter. Sci. 1968, 28(1), 168-170.
- Myer, Y.P. Conformation of cytochromes. III. Effect of urea, temperature, extrinsic ligands, and pH variation on the conformation of horse heart ferricytochrome c. Biochemistry. 1968, 7(2), 765-776.

- Neurath, H. The influence of denaturation on the spreading of proteins on a water surface. J. Phys. Chem. 1936, 40, 361-368.
- Nonomura, Y., Katayama, E., & Ebashi, S. Effect of phosphates on the structure of the actin filament. J. Bioch. 1975, 78, 1101-1104.
- Nutting, G.C., & Harkins, W.D. Pressure area relations of fatty acid and alcohol monolayers. J. Amer. Chem. Soc. 1939, 61, 1180-1187.
- Oncley, J.L. (Ed.) Biophysical science. New-York: Wiley. 1959, 568.
- Pagano, R.E., & Gershfeld, N.L. A millidyne film balance for measuring intermolecular energies in lipid films. J. Coll. Int. Sci. 1972, 41(2), 311-317.
- Patil, G.S., Matthews, R.H., & Cornwell, D.G. Effect of ionization and cation selectivity on the expansion of stearic acid monolayers. J. Lipid Res. 1972, 13, 574-579.
- Pearson, J.T., & Alexander, A.E. The application of monolayer techniques to a study of protein surfactant interaction. I. Interactions in spread films at the air-water interface. J. Coll. Inter. Sci. 1968, 27(1), 53-63.
- Pethica, B.A. Adsorption of surface-active electrolytes at the air/water interface. Trans. Farad. Soc. 1954, 50, 413-421.
- Phillips, M.C. The conformation and properties of proteins at liquid interfaces. Chem. Ind. 1977, 170-176.
- Poulsen, B.J., & Lemberger, A.P. Surface films of soybean lecithin. I. Development of a recording film balance. J. Pharm. Sci. 1965, 54(6), 875-878.
- Rees, M.K., & Young, M. Studies on the isolation and molecular properties of homogeneous globular actin. J. Biol. Chem. 1967, 242(19), 4449-4458.
- Rosano, H.L., Chen, S.H., & Whittam, J.H. Surface drag viscosity of bovine serum albumin monolayers. J. Phys. Chem. 1974, 78, 2266-2270.
- Sauer, K. 3. Primary events and the trapping of energy. Bioenergetics of photosynthesis. Edited by Govindjee. New-York: Academic Press. 1975, 144-155.

- Scatchard, G., Balchelder, A.C., & Brown, A. Products of human plasma fractionation. XVI. Osmotic pressure of plasma and serum albumin. Journal of chemical investigation, 1944, 23, 458-464.
- Schichi, H., Lewis, S.M., Irreverre, F., & Stone, A.L. Biochemistry of visual pigments. Purification and properties of bovine rhodopsin. J. Biol. Chem. 1969, 244(3), 529-536.
- Sears, D.F. Surface activity of urea. J. Coll. Int. Sci. 1968. 29(2), 288-295.
- Shields, J.E., Dinovo, E.C., Henriksen, R.A., Kimbel, R.L., Jr., & Millar, P.G. The purification and amino acid composition of bovine rhodopsin. Biochim. Biophys. Acta. 1967, 147, 238-251.
- Shoemaker, D.P. Experimental in physical chemistry (2nd-3rd edition) Garland, C.W. and Steinfeld, J.I., Mc Graw-Hill. 1974, 725.
- Singer, S.J. Note on an equation of state for linear macromolecules in monolayers. J. Chem. Phys. 1948, 16(9), 872-876.
- Sober, H.A., & Harte, R.A. (Ed.) Handbook of biochemistry (2nd edition) Ohio: The Chemical Rubber Co. 1968-1970.
- Sobotka, H., & Bloch, E. Built up films of steroid compounds. J. Biol. Chem. 1938, 124, 559-566.
- Spudich, J.A., & Watt, S. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. J. Biol. Chem. 1971, 246(15), 4866-4871.
- Squire, P.G., Moser, P., & O'Konski, C.T. Hydrodynamic properties of bovine serum albumin monomer and dimer. Biochemistry. 1968, 7(12), 4261-4272.
- Stallberg, S. Surface films of heat-denatured serum albumin. Trans. Farad. Soc. 1939, 35, 1416-1420.
- Stallberg, S., & Teorell, T. A new method of spreading monolayers of albumin and lipoid-albumin mixtures. Trans. Farad. Soc. 1939, 35, 1413-1416.
- Straub, F.B. Chemistry of molecular contraction. New-York: Academic Press, Szent-Gyorgyi. 1951, 148.

- Strauch, L. Ultramicrodetermination of N in biological material. Z. Khim. Chem. 1965, 3, 165-167.
- Suzuki, A., Ikeda, S., & Isemura, T. Automatic recording systems for monolayer study. Annual rep. of Biol. Works faculty Sc., Osaka University. 1967, 15, 83-96.
- Svedberg, T. Protein molecules. Chem. Rev. 1937, 20, 81-98.
- Svedberg, T., & Nichols, J.B. The molecular weights of egg albumin. J. Am. Chem. Soc. 1926, 48, 3081-3092.
- Svedberg, T., & Nichols, J.B. Application of the oil turbine type of ultracentrifuge to the study of the stability region of carbon monoxide-Hb. J. Am. Chem. Soc. 1927, 49, 2920-2934.
- Svedberg, T., & Sjoegren, B. Molecular weights of serum albumin and of serum globulin. J. Am. Chem. Soc. 1928, 50, 3318-3332.
- Tanford, C. Physical chemistry of macromolecules. John Wiley and Sons Inc. 1961, 710.
- Tanford, C., Kawahara, K., & Lapranje, S. Proteins as random coils. I. Intrinsic viscosities and sedimentation coefficients in concentrated guanidine hydrochloride. J. Amer. Chem. Soc. 1967, 89(4), 729-736.
- Taylor, J.E. Apparatus for the continuous production of triple distilled water. J. Chem. Educ. 1960, 37, 204-205.
- Trillo, J.M., Fernandez, S.G., & Pedrero, P.S. Monocular film of serum albumin bovine (S.A.B.). Annales Quim. 1971, 67(2), 115-124.
- Trurnit, H.J. A theory and method for the spreading of protein monolayers. J. Coll. Sci. 1960, 15, 1-13.
- Trurnit, H.J., & Lauer, W.E. Automatic recording film balance system. Rev. Sc. Instr. 1959, 30(11), 975-981.
- Tvaroha, B. Unimolecular films. I. Measurement of low surface pressures of protein monolayers. Chem. Listy. 1954, 48, 183-188.
- Van Holde, K.E. Physical biochemistry. Prentice-Hall. 1971, 246.
- Van Kley, H.J., & Stahmann, M.A. Electrophoresis of polypeptidyl proteins. J. Phys. Chem. 1956, 60, 1200-1201.

- Vermeglio, A., & Clayton, R.K.C. Orientation of chromophores in reaction centers of Rhodospseudomonas Sphaeroides. Evidence two absorption bands of the dimeric primary electron donor. Biochim. Biophys. Acta. 1976, 449, 500-515.
- Vroman, L., Kanor, S., & Adams, A.L. Surface film pressure recording system. Rev. Sc. Instr. 1968, 39, 278-279.
- Wainio, W.W. The mamalian mitochondrial respiratory chain. New-York: Academic Press New-York. 1970, 499.
- Wald, G., & Brown, P.K. Synthesis and bleaching of rhodopsin. Nature. 1956, 177, 174-176.
- Weber, K., & Osborn, M. Reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide-gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 1969, 244(16), 4406-4412.
- Wetlaufer, D.B. Ultraviolet spectra of proteins and amino acids. Adv. Prot. Chem. 1962, 17, 304-390.
- Willis, R.F. Surface pressure and surface potential measurements of polydimethylsiloxane substituted undecanoic acids on aqueous surface. J. Coll. Int. Sc. 1971, 37, 1-15.
- Wolken, J.J. An experimental organism for biochemical and biophysical studies. Rutgers Univ. Press. 1961, 173.
- Yegiazarova, A.R., & Zaalishvili, M.M. Certain physical constants of the molecules of actin in the monolayer. Biofizika. 1972, 17(4), 588-593.
- Zief, M., & Speights, R. Ultrapurity methods and techniques. New-York: Marcel Dekker Ed., Inc. 1972, 699.

ANNEXE

ANNEXE

Nous avons cru bon de rajouter ici deux tableaux se rapportant aux caractéristiques principales de chacune des protéines.

Le premier se rapporte à la composition en gramme d'acide aminé par 100 g. de protéine. On connaît très bien leur composition de nos jours ce qui peut faciliter le travail préliminaire dans l'estimation de la surface occupée par la protéine à l'interface air/eau.

Le second tableau permet dans notre investigation préliminaire de prévoir le pH utilisable pour la sous-phase puisque l'on connaît le point isoélectrique de chaque protéine. On peut également se baser sur le rapport entre résidus polaires et non-polaires dans l'interprétation d'une solubilisation possible. Dans ce tableau on a aussi certaines valeurs du pourcentage d'alpha-hélicité et du pourcentage de flexibilité qui n'ont pas été très employées par les auteurs travaillant sur les monocouches de protéine. Par contre, le nombre de résidus par molécule est une donnée principale et nous permet d'évaluer rapidement le poids moléculaire de la protéine.

Tableau 12

Composition en g/100g en acide aminé pour les protéines étudiées.

Acides aminés	G-actine ⁽¹⁾ (muscle de lapin)	Albumine ⁽²⁾ de bovin	Cytochrome-c ⁽³⁾ (coeur de cheval)	Oval- ⁽⁴⁾ bumine	Rhodop- ⁽⁵⁾ sine de bovin
Alanine	6.11	8.13	3.52	6.7	7.02
Arginine	1.46	3.89	2.73	5.7	6.31
Asparétique (acide)	10.75	9.36	7.56	9.3	8.64
Cystéine	1.42	6.18	1.69	0.5	2.62
Glutamique (acide)	13.64	13.32	13.05	10.5	11.16
Glycine	4.96	2.83	5.6	3.1	19.01
Histidine	3.82	3.00	3.44	2.3	3.87
Isoleucine	10.35	2.30	5.35	7.0	7.34
Leucine	8.10	10.78	5.62	9.2	10.41
Lysine	6.60	9.89	19.72	6.3	6.87
Méthionine	6.02	0.71	2.07	5.2	4.37
Phénylalanine	4.72	4.59	4.53	7.7	12.71
Proline	5.19	4.95	3.27	3.6	7.87
Serine	6.17	4.59	0.15	8.2	7.23
Thréonine	7.50	5.65	8.36	4.0	8.43
Tryptophane	2.06	0.35	1.54	10.6	----
Tyrosine	6.90	3.36	4.93	3.7	11.16
Valine	5.84	6.18	2.42	7.1	8.83

Références.

1. Elzinga, M., Collins, J.H., Kuehl, W.M. et Adelstein, R.S. (1973)
2. Sober, H.A. et Harte, R.A. (1968-70)
3. Margoliash, E., Kimmel, J.R., Hill, R.L. et Schmidt, W.D. (1962)
4. Long, C. (1968)
5. Shields, J.E., Dinovo, E.C., Henriksen, R.A., Kimbel, R.L., Jr., et Millar, P.G. (1967)

Tableau 13. Caractéristiques principales des protéines étudiées.

	Albumine de bovin	G-actine (muscle de lapin)	Cytochrome c (coeur de cheval)	Ovalbu- mine	Rhodopsine de bovin
P.M.	(voir tableau #10 p. 159)				
Nombre de rési- dus par chaîne	588	374	104	387	273
SH	1	5	2	2	6
nb de chaîne	1	1	1	1	1
rapport entre ré- sidus polaires et non-polaires	1.56	---	2.1	1.26	---
pHi	4.9	4.6	10.0	4.8	5.1
% flexibilité	3.0	---	---	0.8 à pH 7 4.5 à pH 1 ou 2	---
% α -hélicité	50%	---	27.0% oxydé 34.0% réduit	45%	---